

L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DES PROTÉINES
MYÉLOMATEUSES DE TYPE β_2 A:
étude par chromatographie sur DEAE cellulose

THÈSE

présentée

à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon
et soutenue publiquement le 22 février 1963
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Georges RICHARD

Licencié ès Sciences

Ancien Externe des Hôpitaux

C. E. S. d'Hématologie

Diplômé de Sérologie

né le 30 octobre 1935 à Lyon (6^e)

(Travail de la Clinique Médicale C, de l'Institut Pasteur
et du Centre de Transfusion sanguine de Lyon)

(Professeur P. CROIZAT et Professeur Agrégé L. REVOL)

ANNÉE 1963

L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DES PROTÉINES
MYÉLOMATEUSES DE TYPE $\beta_2 A$:
étude par chromatographie sur DEAE cellulose

THÈSE

présentée

à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon
et soutenue publiquement le 22 février 1963
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Georges RICHARD

Licencié ès Sciences

Ancien Externe des Hôpitaux

C. E. S. d'Hématologie

Diplômé de Sérologie

né le 30 octobre 1935 à Lyon (6^e)

(Travail de la Clinique Médicale C, de l'Institut Pasteur
et du Centre de Transfusion sanguine de Lyon)

(Professeur P. CROIZAT et Professeur Agrégé L. REVOL)



FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

	MM.
Doyen Honoraire, membre de l'Institut	J. LEPINE
Doyen, Correspondant de l'Institut	H. HERMANN
Assesseur	M. LEVRAT
Assesseur	L. REVOL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE,
MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLÔS, GUILLEMINET.

PROFESSEURS

	MM.
Physiologie A.	HERMANN
Clinique urologique	CIBERT
Physique biologique	PONTHUS (détaché à Beyrouth)
Clinique neuro-psychiatrique et hygiène mentale	DECHAUME
Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire	ROCHET
Clinique organique et toxicologie	CHAMBON
Clinique chirurgicale B.	WERTHEIMER
Clinique médicale B.	PAUPERT-RAVAULT
Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires	FROMENT
Clinique médicale C.	CROIZAT
Chimie biologique et médicale	ENSELME
Clinique chirurgicale A.	MALLET-GUY
Pharmacie galénique et matière médicale	REVOL
Clinique gynécologique	POLLOSSON
Clinique obstétricale	PIGEAUD
Médecine du Travail	BOURRET
Clinique médicale A.	LEVRAT
Hygiène et action sanitaire et sociale	SOHIER
Clinique médicale infantile et hygiène du premier âge	BERNHEIM
Biologie médicale et pharmacodynamie	JOURDAN
Botanique et cryptogamie	NETIEN
Clinique chirurgicale C.	BERTRAND

Chimie analytique pharmaceutique	BADINAND
Pharmacie chimique et pharmacologie	DREVON
Médecine légale et déontologie	ROCHE
Parasitologie et pathologie exotique	COUDERT
Clinique d'Oto-Rhino-Laryngologie et d'Audio-Phonologie	MOUNIER-KUHN
Clinique ophtalmologique	PAUFIQUE
Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie	THIERS
Clinique de pneumo-phthisiologie	BRUN
Clinique traumatologique des membres	CREYSEL
Cancérologie	DARGENT
Anatomie pathologique	GUICHARD
Pathologie générale et expérimentale	GIRARD Paul
Anatomie	LATARJET
Pathologie chirurgicale	PEYCELON
Thérapeutique	GIRARD Marcel
Pathologie médicale	VACHON
Physio-pathologie des voies respiratoires	GALY
Radiologie	PAPILLON
Clinique des maladies infectieuses	JEUNE
Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale	GONIN
Bactériologie	MONNET
Physiologie et pathologie obstétricales	BANSSILLON
Physiologie B.....	CHATONNET
Clinique endocrinologique	GUINET
Clinique de chirurgie orthopédique	TRILLAT
Clinique stomatologique	FREIDEL
Histologie	X.....
Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles	MARION J.
Matière médicale et législation pharmaceutique	DORCHE

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Physique nucléaire appliquée à la médecine	BERGER
Bactériologie	BERTOYE
Physiologie	CIER J.-François

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Parasitologie	ROMAN
Pharmacie chimique et pharmacologie	CIER André
Chimie organique et toxicologie	PERROT

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Médecine

Anatomie pathologique	FEROLDI
Chimie biologique et médicale	CREYSEL Roger
Anatomie	DUROUX

Thérapeutique	BRETTE
Histologie	DUMONT
Hygiène	THIVOLET
Parasitologie	GARIN
Physique	MORET
Anatomie	BOUCHET
Anatomie pathologique	TOMMASI
Hygiène	RIFFAT
Pathologie expérimentale	JOUVET
Hématologie	FAVRE-GILLY

Pharmacie

Botanique et cryptogamie	ODDOUX
Chimie analytique	MALLEIN
Chimie biologique	GRAS
Physique	PEYRIN

AGRÉGÉS EN EXERCICE

Médecine générale	PONT
Médecine générale	VIGNON
Médecine générale	REVOL
Médecine générale	PLAUCHU
Médecine générale	TRAEGER
Chirurgie générale	MARION
Chirurgie générale	MICHAUD
Chirurgie générale	JAUBERT-DE-BEAUJEU
Chirurgie générale	SAUTOT
Chirurgie générale	GUILLEMIN
Obstétrique	BURTHIAULT
Oto-Rhino-Laryngologie	GIGNOUX
Pédiatrie	FRANÇOIS
Médecine générale	DEVIC
Médecine générale	DESPIERRES
Chirurgie générale	DE MOURGUES
Chirurgie générale	FRANCILLON
Chirurgie générale	SAUBIER
Dermatologie	COLOMB
Médecine légale	COLIN
Médecine du travail	TOLOT F.
Neuro-Psychiatrie	GUYOTAT
Neuro-Psychiatrie	SCHOTT
Obstétrique	DUMONT
Ophtalmologie	BONAMOUR
Urologie	DURAND
Médecine générale	GARDE
Médecine générale	PERRIN
Médecine générale	LARBRE
Médecine générale	MORNEX

MM.

Médecine générale	NORMAND
Chirurgie générale	MARET
Chirurgie générale	DESCOTES
Electro-radiologie	CHASSARD
Neuro-chirurgie	ALLEGRE
Ophthalmologie	HUGONNIER
Orthopédie	FAYSE
Oto-Rhino-Laryngologie	GAILLARD
Pneumo-Phtisiologie	KALB

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. Professeur P. CROIZAT, président
Professeur J. CHOPIN
Professeur J.-F. CIER
Professeur Agrégé R. CREYSSEL
Professeur Agrégé L. REVOL

A MON GRAND-PÈRE

A MES PARENTS

A MA FEMME

A MA FILLE

A TOUTE MA FAMILLE

A MA BELLE-FAMILLE

A MES AMIS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A NOTRE MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur P. CROIZAT

Professeur de Clinique Médicale à la Faculté de Médecine de Lyon

Directeur de l'Institut Pasteur de Lyon

Qu'il sache toute l'admiration que nous avons pour lui. Au cours d'un semestre passé dans son service, et de plusieurs années dans les laboratoires de l'Institut Pasteur, nous avons pu apprécier la bienveillante sollicitude qu'il prodigue à tous ses élèves, et son immense culture médicale, qui font la force de son enseignement.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur J. CHOPIN

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté des Sciences

Nous sommes fier d'avoir été son élève.

Il nous témoigne en acceptant de faire partie de notre jury un intérêt dont nous sommes particulièrement touché.

Qu'il soit assuré de notre gratitude, et de notre respectueuse fidélité.

Monsieur le Professeur J.-F. CIER

Professeur de Physiologie à la Faculté de Médecine

Nous avons eu l'occasion d'apprécier la clarté et la précision de son enseignement. Il a bien voulu s'intéresser à notre travail, qu'il en soit remercié.

Monsieur le Professeur Agrégé R. CREYSSEL

De longs mois passés dans son laboratoire nous ont permis d'apprécier la grande sollicitude dont il sait entourer ses collaborateurs ; qu'il trouve ici le témoignage de notre reconnaissance.

Monsieur le Professeur Agrégé L. REVOL

Médecin des Hôpitaux

Il nous a toujours témoigné une grande bienveillance, qu'il soit assuré de notre respectueux attachement.

A NOS MAITRES DANS LES HOPITAUX

Monsieur le Professeur P. BERTRAND

Monsieur le Professeur Agrégé Georges GUILLEMIN

Monsieur le Professeur DARGENT

Monsieur le Professeur PAPILLON

Monsieur le Professeur POLLOSSON

Monsieur le Professeur THIERS

Monsieur le Professeur GUICHARD

Monsieur le Professeur P. CROIZAT

Monsieur le Professeur Agrégé L. REVOL

A NOS MAITRES DE LA FACULTÉ, de l'INSTITUT PASTEUR et du CENTRE DE
TRANSFUSION SANGUINE

Hématologie et hématologie supérieure:

Monsieur le Professeur P. CROIZAT

Monsieur le Professeur Agrégé L. REVOL

Monsieur le Professeur Agrégé J. FAVRE-GILLY

Monsieur le Docteur P. MOREL

Grâce à qui nous aimons la cytologie sanguine

Monsieur le Docteur A. JOUVENCEAUX

Sérologie:

Monsieur le Professeur R. SOHIER

Monsieur le Professeur Agrégé J. THIVOLET

Bactériologie:

Monsieur le Professeur P. MONNET

Monsieur le Professeur A. BERTOYE

Monsieur le Docteur CARRAZ

Au Docteur J. BERTRAND
Maître de Recherches à l'Institut National d'Hygiène

Nous lui sommes reconnaissant pour l'amitié qu'il nous a toujours témoignée.

A Mademoiselle Y. CILLE
Ingénieur Chimiste
Attachée de Recherches à l'Institut National d'Hygiène

Qui trouve, elle aussi, dans la chromatographie une source de longue et patiente recherche.

Au Docteur Y. MANUEL
Attaché de Recherches au C. N. R. S.

*Le gel d'amidon n'a plus de secrets pour lui.
Nous avons souvent abusé de sa collaboration.
Qu'il en soit ici amicalement remercié.*

A tous les membres du laboratoire de chimie biologique de l'Institut Pasteur.

A tous nos camarades des Hôpitaux et de la Faculté.

A tous nos amis.

INTRODUCTION

Il n'est pas nécessaire de rappeler l'importance qu'a prise depuis quelques années l'étude des protéines sanguines, normales et pathologiques, en biochimie humaine.

Mais si autrefois, leur étude était surtout quantitative et basée sur des données statiques, il n'en est plus de même actuellement, et l'on sait l'importance accordée aujourd'hui à leur métabolisme normal et pathologique.

L'étude des affections dysprotéïnisantes a pris une orientation nouvelle de ce fait, depuis quelques années. On les classait alors d'après leurs symptômes cliniques. On se contentait de constater qu'à ces syndromes correspondaient souvent des modifications quantitatives des protéines sériques comme le montrait par exemple l'électrophorèse sur papier. Mais, très vite, à l'étude clinique descriptive de ces affections, s'ajoutèrent des données plus précises de laboratoire. On s'aperçut que ces manifestations pathologiques souvent diverses pouvaient être reliées entre elles par des composants communs, variation quantitative d'une ou plusieurs protéines sériques bien définies, mais surtout variation qualitative de ces protéines.

Il y a, en effet, dans ces affections que sont le myélome, la maladie de WALDENSTROM et apparentées, apparition de « bandes étroites » à l'électrophorèse, molécules d'aspect anormal, dont l'existence fut qualifiée tantôt de dysprotéïnémies, tantôt de paraprotéïnémies. Certains auteurs qualifient de dysprotéïnémie toute variation quantitative des protéines par rapport au tracé fourni par un sérum normal. C'est pourquoi nous préférons au terme de dysprotéïnémies celui de paraprotéïnémies.

Ce terme fut utilisé pour la première fois par APITZ (1940) pour caractériser les protéines du myélome multiple.

Nous ne discuterons pas ici sa valeur. Nous indiquerons simplement le sens que nous lui avons donné dans ce travail. Nous englobons dans les paraprotéines les composants protidiques aberrants du « système gamma » qui, par rapport à celles du sérum normal sont en *surnombre*, qu'elles soient anormales ou simplement le résultat d'une exacerbation d'un processus physiologique.

Quoi qu'il en soit, l'étude qualitative de ces protéines à laquelle s'attachent surtout les recherches actuelles, a pris une orientation particulière et a conduit à considérer ces affections comme des « maladies moléculaires ». Ici comme dans les hémoglobinoses, l'intérêt tend à se déplacer, et ce que l'on cherche finalement à identifier, c'est le trouble de la synthèse protéique portant sur les peptides. C'est au niveau de la molécule et de sa fonction qu'il faut aller chercher la clef du problème.

Ce but nécessite comme condition préliminaire une définition exacte des

espèces protéiques présentes, la séparation de molécules définies par le plus grand nombre de critères possibles.

Il est donc intéressant pour ce faire de développer les techniques qui permettent une séparation de plus en plus poussée de groupes de molécules protéiques de plus en plus homogènes dans leur structure chimique et leur fonction.

C'est, en effet, la principale difficulté à laquelle on se heurte, lorsqu'on pense avoir isolé une entité protéique. Or, est-on jamais sûr que toutes les molécules que renferme la solution forment bien une population homogène? L'étude des γ globulines donne un exemple frappant de la complexité de ce problème: le classique sommet γ que définit TISELIUS lorsque le premier il commença à démembrer les protéines sériques, présente un aspect différent de celui de la courbe de Gauss, laissant prévoir une hétérogénéité. On peut, en effet, en tirer six protéines différentes, comme le montre HEREMANS par immunoélectrophorèse. Parmi celles-ci, la globuline γ au sens immunochimique du terme, reprise par BISERTE, FAHEY et d'autres auteurs, montre après chromatographie sur DEAE-cellulose, une microhétérogénéité mise en évidence par l'étude des mobilités des fractions obtenues. De nombreuses autres études physico-chimiques et immunologiques concourent à démontrer l'hétérogénéité des γ globulines. Il semble en être de même pour la β_2A normale et pathologique.

Dans un précédent travail (16) nous avons participé à l'étude de l'hétérogénéité des paraprotéines du myélome β_2A , par électrophorèse en gel d'amidon. Il nous a paru intéressant de continuer cette étude en usant cette fois d'un autre instrument de dégrossissage fourni par la cellulose modifiée à radicaux actifs, essentiellement diéthyl aminoéthyl ou DEAE-cellulose.

Cette technique, qui commence actuellement à apporter d'importants renseignements dans l'étude des protéines, en particulier des paraprotéines, est due à PETERSON et SOBER (1956).

Nous avons adopté comme système de référence, pour la détermination qualitative de nos fractions, les méthodes électrophorétiques maintenant bien codifiées que sont l'électrophorèse en gélose, l'immunoélectrophorèse, l'électrophorèse en gel d'amidon, enfin l'électrophorèse en veine liquide au moyen de l'appareil de TISELIUS, pour la recherche des mobilités.

D'autre part, on sait l'importance du point de vue didactique, de l'étude du cas pathologique, pour éclaircir la compréhension du cas physiologique normal. C'est pourquoi nous nous sommes adressés aux paraprotéines, dans le cas du myélome, et plus particulièrement du β_2A myélome.

Dans un premier temps, nous nous sommes efforcés de tracer la carte de la correspondance en chromatographie des protéines sur DEAE cellulose du sérum normal, et en gel d'amidon, de façon à avoir une base de référence.

Ensuite nous avons isolé les paraprotéines β_2A myélomateuses de quelques sérums, afin de les comparer entre elles, et avec les protéines physiologiques, les « immunoglobulines » correspondantes, ceci au point de vue de leur antigénicité et de leur comportement chimique.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Chimie biologique de l'Institut Pasteur de Lyon, grâce à l'aide matérielle efficace de son Directeur, notre maître Monsieur le Professeur CROIZAT. Nous l'avons effectué sous la direction de Monsieur le Professeur Agrégé CREYSEL, qui, en plus d'une aide technique

certaine, nous a fait bénéficier de connaissances précises, et d'une grande expérience de la recherche, sans lesquelles nous n'aurions pu mener ce travail à bien.

Cet exposé comportera trois parties:

1° une partie technique, comportant le rappel des techniques électrophorétiques et immunologiques utilisées pour la reconnaissance qualitative des fractions chromatographiques, ainsi qu'une étude de la méthode chromatographique elle-même.

2° Une seconde partie biochimique, où après un rappel des notions connues, sur les immunoglobulines, en particulier sur la β 2A globuline, nous exposerons la manière dont nous avons abordé leur étude, ainsi que celle des protéines myélomateuses.

3° Dans une troisième partie, nous exposerons les résultats que nous a fournis la pratique de la méthode chromatographique.

PREMIÈRE PARTIE

I. GÉNÉRALITÉS

A. HISTORIQUE

Séparation des protéines par chromatographie sur colonne

La séparation des protéines par chromatographie nécessite un matériel échangeur d'ions possédant non seulement un grand pouvoir d'adsorption des protéines, mais aussi nécessitant des conditions d'élution suffisamment douces de pH, de température et de force ionique, ceci afin de ne pas dénaturer les protéines.

Les résines échangeuses d'ions ont été largement employées à cet effet, pour l'isolement de protéines bien définies. Ont été utilisées entre autres les résines Amberlite IRC 50 (HUISMAN et PRINS), Dowex 50 (NH₄⁺) (SOBER et coll. 1957) Dowex 2 (Cl⁻) (BOMAN 1955) Amberlite IR-4B (acétate⁻) (WALEY 1957).

On a pu ainsi isoler différentes protéines telles que la ribonucléase, la lysozyme du blanc d'œuf (TALLAN et STEIN 1953), le cytochrome C (MARGOLIASH 1953), la carboxyhémoglobine (BOARDMAN et PARTRIDGE 1955). Le sérum humain a été séparé sur Dowex 2 (Cl⁻) en β globuline, albumine, α globuline et γ globuline, dans cet ordre de sortie de colonne, par BOMAN (1955).

Séparation des protéines sur cellulose échangeuse d'ions

Un tel matériel présente sur les résines l'avantage d'une plus grande surface de contact, ainsi qu'un pouvoir d'adsorption plus élevé des protéines. La cellulose elle-même possède ces propriétés et a été utilisée dans le fractionnement des protéines (PAYNE et coll. 1950). Mais la technique a été très améliorée par l'utilisation de dérivés de la cellulose, telle la cellulose acétolysée, ou de dérivés tels que la DEAE cellulose, la carboxyméthyl cellulose ou CM cellulose (PETERSON et SOBER 1956). Ont été également utilisées la sulphométhyl cellulose, l'ECTEOLEA cellulose, la triéthylaminoéthyl ou TEAE cellulose (PORATH 1957).

Enfin, la mise au point et la commercialisation du DEAE Sephadex permet d'associer au pouvoir d'échangeur du radical DEAE, un effet de filtration dû aux petites molécules glucidiques calibrées du sephadex. Nous montons actuellement au laboratoire cette technique, dont nous attendons beaucoup.

Propriétés de ces celluloses

On sait que la fibre de cellulose est constituée par une longue chaîne de molécules de β glucopyranose. Chaque unité de ce β -glucopyranose possède encore 3 fonctions alcool libres, une primaire et deux secondaires. Il est possible de greffer sur ces chaînes des composés à fonction basique tels qu'ils transforment la cellulose en échangeur d'anions, fonctionnant comme les résines anioniques polymères de synthèse.

Il convient seulement de conserver à la cellulose ses propriétés physiques de structure et de stabilité. Si de plus, la cellulose modifiée conserve une solubilité nulle, on aura un absorbant d'autant meilleur qu'en milieu aqueux la cellulose a tendance à se gonfler, sans toutefois atteindre l'encombrement des résines synthétiques vis-à-vis des molécules protéiques, évitant ainsi que se surajoute un effet de filtre sur les protéines.

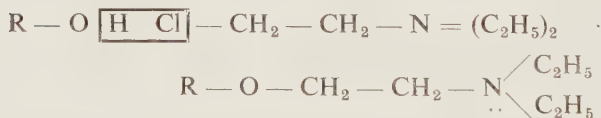
Pour notre part, nous avons été amenés à utiliser les deux plus courantes: DEAE et CM cellulose.

B. LA MÉTHODE CHROMATOGRAPHIQUE SUR DEAE ET CM CELLULOSE

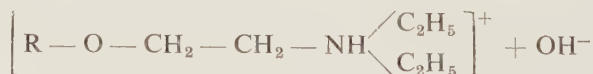
1° Leur principe de fonctionnement.

La DEAE cellulose, de par la nature de ses constituants, a un caractère faiblement basique, alors que la CM cellulose a un caractère acide plus marqué.

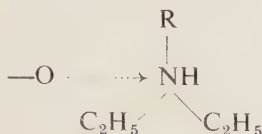
Le principe de sa préparation est le suivant : on prépare de la cellulose pure, homogène, de façon à éliminer les trop fines particules qui freinent le passage du liquide dans la colonne à chromatographie. On lave par l'acétone de façon à éliminer l'eau et on sèche. On obtient une poudre blanche de cellulose, à laquelle on va faire subir une estérification, d'après la technique décrite par PETERSON et SOBER (1956). On se place en milieu fortement alcalin, de telle sorte que les fonctions alcooliques se comportent comme un acide, en libérant un proton. On condense ces radicaux avec la 2-chloro-triéthylamine (sous forme de chlorhydrate) dont l'atome de chlore est rendu fortement électro-négatif par la présence de la fonction amine, d'autant que celle-ci est substituée par deux radicaux éthyl. On obtient l'étheroxyde correspondant :



L'atome d'azote possède encore un doublet électronique libre, qui en milieu aqueux va pouvoir donner une liaison semi-polaire avec des anions, soit avec un radical anionique libre, d'une protéine, d'où le rôle d'échangeur de la DEAE cellulose, soit avec une molécule d'eau:



Ceci donnerait théoriquement à la cellulose un caractère basique accentué (celui d'une diéthylamine). Mais le caractère basique expérimental est en fait faible. On interprète ceci en disant qu'il se forme entre l'azote porteur d'un hydrogène semi-polaire et un oxygène une liaison hydrogène partielle, venant masquer en partie le caractère basique de la molécule.



Techniques de préparation de la DEAE et de la CM cellulose

On opère suivant la technique originale donnée par PETERSON et SOBER (75). Cette méthode permet de fixer sur la cellulose une quantité déterminée de groupements basiques exprimés en meq/g d'échangeur, le nombre de groupements par gramme étant à peu près une fonction linéaire de la quantité de substance réagissant (la 2-chloroéthylamine dans le cas envisagé), à condition de ne pas fixer plus de 1 millimole par gramme.

Cette fixation de groupements basiques hydrophiles se fait aux dépens de liaisons secondaires assurant la cohésion des chaînes macromoléculaires de la cellulose, réalisées par des ponts hydrogènes entre les hydroxydes alcooliques, responsables de leur insolubilité.

La suppression de ces ponts fait perdre à la cellulose son insolubilité, et lui confère la propriété de gonfler dans l'eau; de ce fait un trop grand nombre de substitutions rend la DEAE cellulose impropre à la chromatographie. Dans ce but, on n'introduit qu'un nombre limité de fonctions basiques hydrophiles, limitant ainsi la capacité d'adsorption de la cellulose.

D'autre part, il y a sans aucun doute des liaisons multiples qui s'établissent entre les fonctions polaires de l'échangeur et celles de la protéine: une cellulose peu substituée d'une capacité de fixation toutefois suffisante, permettra une diminution de ces liaisons, et favorisera la désorption des protéines, lors de leur élution. Le faible pouvoir tampon de la DEAE cellulose, sa faible capacité d'adsorption pour les petits électrolytes, augmentent encore sa qualité d'utilisation.

2^o Mode d'emploi de ces celluloses.

Nous procédons de la façon suivante: la DEAE cellulose en poudre est lavée sur Büchner par NaOH M jusqu'à ce que le filtrat soit incolore. Il est préférable de laisser la soude en contact une nuit avec la cellulose avant de la filtrer. On constate que le filtrat est jaune. Il faut plusieurs bains de soude avant qu'il devienne clair.

A partir du second bain de lavage, il suffit d'utiliser de la soude 0,1 M qui est suffisamment concentrée pour assurer un lavage correct de la cellulose, tout en ne provoquant pas un gonflement trop accentué de celle-ci, ce qui rendrait la filtration difficile.

On lave ensuite à l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau du filtrat soit au même pH que l'eau de lavage. Ceci demande une assez grande quantité d'eau de lavage. On a intérêt pour accélérer celui-ci à assécher de temps à autre la cellulose.

lose au moyen de l'aspiration fournie par une trompe à vide, jusqu'à ce que le gâteau de cellulose prenne un aspect craquelé. Puis on le remet en suspension dans l'eau distillée en une pâte homogène, avant de replacer le tout sur Büchner.

La cellulose est alors conservée en solution aqueuse à la température du laboratoire. On peut ajouter un antiseptique pour éviter toute pousse de micro-organismes.

On procède de la même façon pour la préparation de la CM cellulose.

3° Les caractéristiques physico-chimiques de la DEAE cellulose.

a) CARACTÉRISTIQUES MÉCANIQUES

Le passage à travers la cellulose d'une solution est conditionné par la grosseur de ses grains. La solution qui consiste à établir une pression au sommet de la colonne pour obtenir un débit liquidien suffisant, pose des problèmes techniques qui rendent les manipulations plus longues. Nous avons obtenu une cellulose satisfaisante en procédant de la manière suivante ; on met 100 à 200 g de cellulose modifiée en suspension dans l'eau dans un grand bécber de 2 litres. On élimine par décantation les grains de cellulose trop fins qui ne sédimentent pas dans un temps court, de l'ordre de 5 minutes. On répète cette décantation deux ou trois fois. Le sédiment obtenu est apte à être utilisé pour une chromatographie. Comme d'autre part la capacité de fixation de la cellulose est indépendante de la taille de ses grains, on aura intérêt, lors de l'utilisation de colonnes de capacité relativement importante, dans le cas de chromatographies préparatives par exemple, à utiliser de préférence les plus gros grains, si on veut avoir un débit liquidien suffisant en sortie de colonne.

b) CAPACITÉ DE LA CELLULOSE

La capacité de fixation de la cellulose est directement liée au nombre de groupements étherifiés. Ceux-ci peuvent être évalués en mesurant la teneur en azote de la cellulose par rapport au poids sec, suivant la méthode de MARCHIS et MOURENS (5). C'est une méthode précise mais longue. Une autre méthode plus commode consiste à réaliser une titration potentiométrique de la DEAE cellulose. Cette méthode permet également de mesurer l'influence du pH et le rôle du pK de la solution, et ses résultats sont identiques à ceux obtenus par la méthode de MARCHIS et MOURENS. Pour ce faire, on met une quantité suffisante (10 g) de DEAE cellulose en suspension dans de l'eau distillée. Par de la soude N on amène le pH à une valeur de 11 en brassant au moyen d'un agitateur magnétique. A ce moment, les fonctions basiques de la cellulose sont à l'état ionisées. On ajoute alors l'acide chlorhydrique en quantité connue, on mesure le pH. On opère sur un témoin sans cellulose. La différence entre les quantités d'acide chlorhydrique nécessaires pour amener la solution à un même pH dépend de la capacité de la cellulose. Si on trace alors le pH en fonction de la quantité en meq d'acide chlorhydrique versé, on obtient une courbe de titration en S plus ou moins aplati, débutant par une variation rapide du pH, puis faible, avec un point d'inflexion, et se terminant par une nouvelle chute rapide du pH, lorsque tous les groupements basiques de l'échangeur sont ionisés. O'DONNELL et THOMPSON (71) ont montré l'influence de la température sur cette courbe : plus la température décroît, plus le nombre de groupe-

ments basiques ionisés décroît pour un pH donné. De telle sorte qu'une température inférieure aura les mêmes effets sur la dissociation des groupements basiques de la cellulose, qu'une diminution du pH de la solution.

c) CONDITIONS OPTIMALES D'UTILISATION DE LA CELLULOSE COMME ÉCHANGEUR D'IONS

Pour utiliser au mieux les propriétés d'un échangeur il faut se placer au pH, pour lequel il y a autant de groupements fonctionnels actifs dissociés que de non dissociés, c'est-à-dire au pK.

Dans le cas de la DEAE cellulose employée, nous avons obtenu la courbe de titration suivante : variations du pH en fonction du volume d'acide chlorhydrique 0,1 M versé.

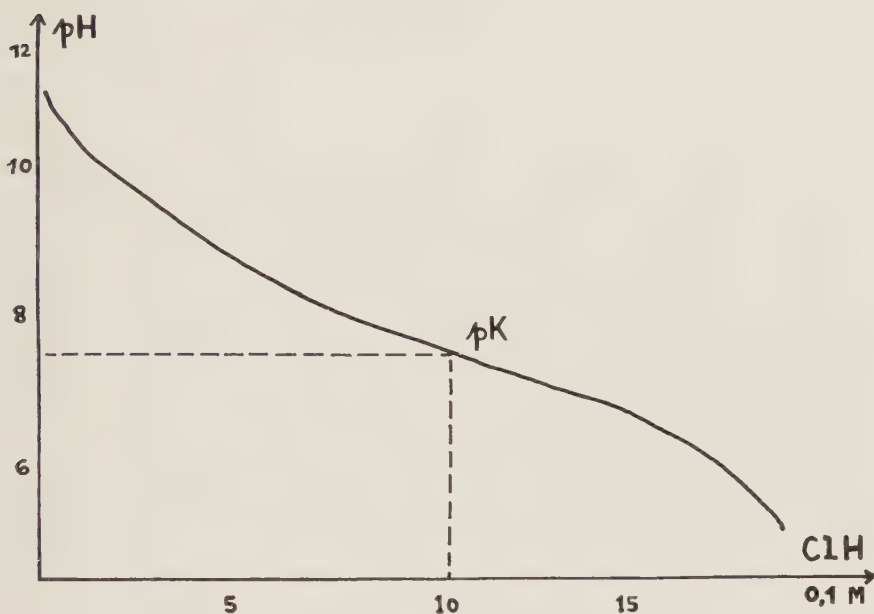


FIG. N° 1 - Détermination du pK de la DEAE cellulose.

Le pK est trouvé égal à 7,5. On pourra employer cette cellulose dans la zone où le rapport entre la variation du nombre de groupements ionisés par rapport à une différence donnée de pH est le plus grand, c'est-à-dire entre pH 8 - 9 et pH 4,5 comme le montre la courbe. Mais les conditions d'élution vont dépendre également de la protéine elle-même.

d) CONDITIONS DE FIXATION ET D'ÉLUTION DES PROTÉINES

Une protéine déterminée possède un certain nombre de groupements polaires, par lesquels va se faire la fixation sur la cellulose. Tout facteur agis-

sant sur ces liaisons va modifier les conditions de fixation de la protéine. Agiront ainsi les modifications de pH, de température, de force ionique. Interviendront également les autres protéines présentes dans ce milieu, ainsi que les dimensions et la forme de la protéine elle-même.

α) Influence de la température

Cette influence se fait sentir aussi bien sur les radicaux actifs de la protéine que sur ceux de la cellulose, comme l'ont montré O'DONNEL et THOMPSON (71). En diminuant la température à laquelle la chromatographie est effectuée on augmente le pK de la protéine. Dans ces conditions celle-ci sera éluée avec un tampon de force ionique inférieure et de pH plus élevé. Ceci permet, comme le font remarquer ces auteurs, de diminuer le volume de tampon nécessaire à l'élution de la protéine. Le pic obtenu au spectrophotomètre enregistreur présente un aspect plus pointu. On aura donc un pouvoir séparateur meilleur.

Mais, beaucoup plus importants que la température sont les trois autres facteurs.

β) Influence du pH

Le pH intervient en modifiant la charge électrique de l'ensemble adsorbant, protéine adsorbée. D'autre part le mode de fixation d'une protéine dépendra de son pH isoélectrique. Si le pH du tampon éluant est supérieur ou inférieur au pH isoélectrique de la protéine, celle-ci se comportera comme un acide ou comme une base — l'échangeur se comportant comme une base faible puisque son pK est voisin de 7,8 dans le cas de la DEAE cellulose —. Les protéines fixées seront chargées négativement pour ce pH si leur point isoélectrique est inférieur à la valeur de ce pH. Si l'on abaisse progressivement le pH du tampon, on obtiendra l'élution d'une protéine donnée lorsque le pH deviendra inférieur au point isoélectrique de celle-ci.

Au contraire, si l'on augmente le pH, la charge de l'échangeur s'annule lorsque la valeur du pH égale celle du pK, puis devient négative, et tend vers zéro. Pour un pH très élevé, l'échangeur est pratiquement désionisé, et l'on obtient l'élution complète de toutes les protéines. C'est pourquoi on utilise la soude pour régénérer la DEAE cellulose.

γ) Influence de la force ionique

A une variation de force ionique du milieu ambiant, obtenue par la variation de concentration du tampon d'élution, correspondra une variation de dissociation des radicaux actifs de la protéine, et partant une variation du pH isoélectrique, si bien qu'une augmentation de force ionique aura le même effet qu'une diminution de pH et inversement.

Au cours d'une chromatographie, comme la cellulose modifiée possède une zone d'utilisation optimale fixe, caractéristique de la cellulose, et centrée par son pK, on aura donc intérêt à se placer dans la zone de pH correspondante, et à provoquer une variation de force ionique pour obtenir l'élution des protéines, plutôt que de pratiquer une variation de pH sans modification de la force ionique, ce qui aurait pour effet de placer l'échangeur dans des conditions défavorables à son fonctionnement.

δ) *Influence des autres protéines du milieu*

C'est le facteur peut-être le moins connu parmi ceux qui interviennent dans un chromatogramme. C'est pourtant un des facteurs les plus importants. Nous étudierons ses effets plus en détails, en donnant quelques exemples expérimentaux. Voyons dès maintenant ce que l'on peut en penser du point de vue théorique.

Deux facteurs interviennent : les dimensions de la molécule et la densité de charges à sa surface. C'est ainsi qu'à densité de charges égale, ce sera la protéine de poids moléculaire le plus élevé qui se fixera sur la colonne de façon préférentielle. C'est théoriquement un moyen de séparer des polymères. En fait, nous verrons qu'une séparation complète de deux polymères, est difficile, d'autant qu'une protéine possédant une charge différente peut être éluée en même temps qu'une autre, de poids moléculaire tel que les deux protéines possèdent au total un nombre de charges équivalentes. C'est ainsi que la sidérophiline nous a longtemps gênés dans la purification de la protéine myéломateuse comme nous le verrons ultérieurement.

II. LA TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE TELLE QUE NOUS L'AVONS MISE EN ŒUVRE A PARTIR DE LA CELLULOSE COMMERCIALE

A) MATÉRIEL ET MÉTHODE

1° Montage de la colonne.

La cellulose en solution dans l'eau distillée est d'abord équilibrée avec le tampon de départ de la chromatographie: tampon phosphate 0,005 M à pH 8 pour la DEAE cellulose, la plus habituellement employée; tampon phosphate 0,01 M à pH 4,5 pour la CM cellulose. On ajoute au besoin quelques gouttes d'acide chlorhydrique pour obtenir le pH désiré. L'expérience montre qu'il faut laver la cellulose avec au moins six fois son volume de tampon pour avoir une équilibration correcte.

La cellulose est ensuite passée sur une colonne à chromatographie de 2×15 cm, comportant à sa base un verre fritté n° 1. Le tassement de la colonne est obtenu à la fois par pression au sommet de la colonne, par l'intermédiaire d'une bouteille d'azote, et par succion à sa base au moyen d'une trompe à vide, ceci pour éliminer les gaz éventuellement dissous dans la solution. Enfin la colonne est entourée d'un manchon à circulation d'eau, qui permet d'effectuer la chromatographie à température constante.

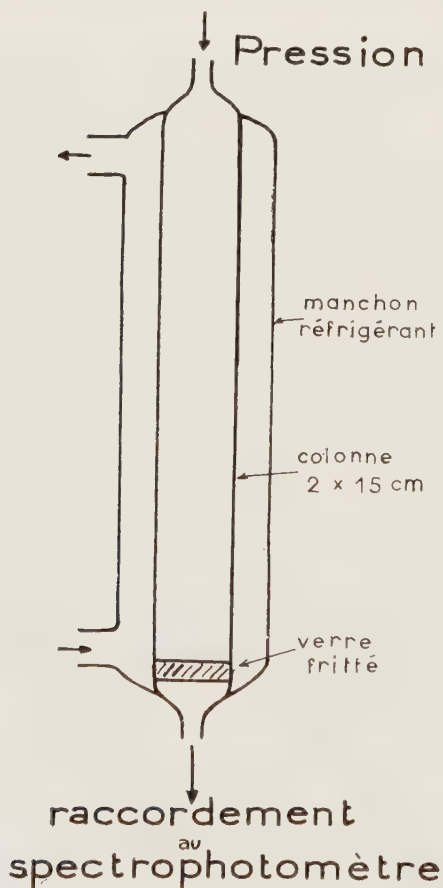


FIG. N° 2 - Colonne à chromatographie.

Nous avons utilisé une température de $+ 2^{\circ} \text{C}$, comme la plupart des auteurs le font. La cellulose doit être répartie de façon homogène. De même, la surface de la cellulose à l'intérieur de la colonne doit être plane, sinon il vaut mieux recommencer.

En effet, une surface tourmentée est à l'origine d'une distribution non homogène de l'échantillon à analyser, à l'intérieur de la cellulose. Une protéine donnée, lorsqu'elle sera éluée, présentera à la sortie de la colonne une répartition irrégulière, une traînée plus ou moins importante suivant le degré de perturbation apporté par le passage à travers la colonne.

Comme il s'agit d'une chromatographie par adsorption et non pas sur support inerte, on risquera peu le mélange des pics, tout au moins tant qu'on opère avec un gradient de concentration nul pour le tampon d'élution.

Par contre, on prolonge considérablement le temps de passage de la protéine considérée, et partant le volume de tampon minimum nécessaire à son élution.

D'autre part, on modifie la forme du pic obtenu à l'enregistreur, pic témoin du passage de protéines à la sortie de la colonne. Or ceci est important, puisque nous verrons que l'on peut tirer quelques conclusions de la forme de ce pic d'élution. Certains auteurs placent au sommet de la colonne un disque de papier filtre ou une pastille inerte genre mousse de polyurée. Nous en avons abandonné l'emploi, car une colonne correctement remplie et tassée permet de placer l'échantillon sur sa surface sans que celle-ci soit modifiée, à condition qu'on opère avec suffisamment de douceur. Si la surface est perturbée, cela indique que la colonne n'est pas correctement tassée et qu'il vaut mieux recommencer le remplissage de la colonne.

2^o Caractéristiques de la cellulose.

a) *La quantité de cellulose* à employer dépend de la quantité de protéines introduite. Le nombre de milliéquivalents par gramme de cellulose mesure la capacité de fixation de l'adsorbant. Cette capacité est donnée par le fabricant, et est rapportée au poids sec de cellulose. Nous avons employé des quantités de sérum variant entre 15 et 5 ml, ou, lorsqu'il s'agissait de fractions protéiques déjà purifiées, une quantité de protéines correspondante. La quantité de cellulose employée, toujours largement calculée, oscillait entre 8 et 15 g.

b) *Les dimensions de la colonne* doivent être calculées en conséquence. Ce qui importe, c'est le rapport entre le diamètre de la colonne et sa hauteur. La hauteur de la colonne doit être comprise entre 5 et 10 fois son diamètre, ceci pour obtenir un pic d'élution suffisamment pointu.

c) *Le volume mort de la colonne* est le volume de la phase mobile, compris entre les grains de cellulose. Il dépend du degré de tassement de celle-ci et des différents facteurs capables de retenir une certaine quantité d'ions sur la cellulose: pH, force ionique, nature des ions, tension superficielle, température. Ce volume mort est en gros égal au volume de la cellulose elle-même.

Nous verrons que la connaissance du volume de cet espace mort est utile lorsqu'on utilise un gradient de concentration au cours d'une chromatographie, car il permet de savoir quels étaient la force ionique et le pH du tampon ayant élué une protéine donnée, lorsque celle-ci émerge de la colonne.

En effet, le tampon qui pénètre à ce moment dans la colonne a par rapport à celui qui en sort une composition qui a varié: force ionique supérieure et pH inférieur.

d) *Le débit de la colonne* influe théoriquement sur la séparation des pics d'élution, puisqu'on pourrait s'attendre à ce qu'un débit trop rapide favorise les traînées. C'est pourquoi certains auteurs ont préconisé des débits très faibles pour l'éluat, débits inférieurs à 5 ml/heure, pour des quantités de sérum de l'ordre de 5 à 15 ml. La plupart des auteurs utilisent un débit de 25 ml/heure. Certains ont utilisé des débits beaucoup plus élevés de 150 à 200 ml/heure, et ont obtenu un tracé chromatographique qui n'était pas perturbé.

Pour notre part, nous avons utilisé le débit obtenu à travers nos colonnes en utilisant une pression légère de l'ordre de 150 cm d'eau. Le débit varie entre 20 et 40 ml/heure, sans que nous ayons constaté de différences dans les chromatogrammes. Le débit a d'ailleurs tendance à diminuer au cours d'une chromatographie, par tassement de la colonne.

A la fin de chaque chromatographie, la cellulose est remise en solution dans un bain de soude 0,1 M pour régénération. On obtient celle-ci, comme dans le cas de la cellulose vierge, par lavage à la soude 0,1 M, puis à l'eau distillée, jusqu'à ce que l'eau de lavage soit au même pH que l'eau distillée employée. Nous n'avons constaté aucune dégradation du pouvoir de fixation de la cellulose au cours des manipulations successives. Simplement, il convient de traiter périodiquement la cellulose par un lavage à l'alcool-acétone, afin d'éliminer les lipides, qui restent fixés sur la cellulose, malgré le lavage à la soude, et qui finissent par diminuer notablement sa capacité de fixation.

3° *Mise en place de l'échantillon à chromatographier.*

L'adsorbant cellulosique ainsi obtenu possède une capacité d'adsorption de l'ordre de 0,38 meq. par gramme.

Nous avons toujours calculé nos quantités de protéines de façon à avoir un léger excès d'adsorbant, de telle sorte que la cellulose ne soit jamais entièrement saturée, ceci pour éviter qu'une partie des protéines ne passe directement à travers la colonne sans être fixée.

La solution protéique étudiée est dialysée à + 4° C pendant un temps minimum de 24 h. contre le tampon de départ, et amenée à un pH égal ou inférieur à 5 dans le cas de la CM cellulose, et à pH 8 dans le cas de la DEAE cellulose. On constate toujours la formation d'un léger précipité, correspondant à environ 4 % du total des protéines de départ. Ce précipité est placé sur la colonne avec le reste de l'échantillon à analyser, afin de récupérer pour la chromatographie, toute protéine du précipité qui arriverait à se solubiliser dans le tampon d'élution.

L'échantillon doit être mis en place sans perturber l'horizontalité de la cellulose. Nous utilisons pour cela une seringue montée munie d'un cathéter en matière plastique fixé sur l'aiguille, permettant d'amener le liquide doucement au contact de la paroi de la colonne, au voisinage de la surface de la cellulose. On met en place l'échantillon lorsque la surface du tampon affleure celle de la cellulose non sans avoir mis en marche le système de réfrigération de façon à réaliser un équilibre des températures.

4° Alimentation de la colonne.

Les protéines fixées sur la DEAE cellulose sont éluées au moyen d'un tampon fourni par un système d'alimentation branché au sommet de la colonne. On joue sur les deux facteurs d'élution: diminution du pH et augmentation de la force ionique. On peut faire varier les deux facteurs simultanément; on en maintient un constant. C'est généralement le pH qui reste constant, d'une part parce qu'il vaut mieux utiliser la DEAE cellulose à son pH optimal (correspondant au pK), d'autre part parce qu'il est préférable de tenir compte également du pH isoélectrique de la protéine étudiée. Enfin, on peut amener ces deux facteurs d'élution à varier de façon discontinue ou au contraire progressive.

Ceci nous amène à envisager le problème des gradients.

a) ÉLUTION PAR GRADIENT DISCONTINU

On emploie pour l'élution une succession de tampons de force ionique croissante, que l'on fait passer les uns après les autres, dans la colonne. Chaque tampon élue un certain nombre de protéines et on voit se former un pic par tampon, ou, quelquefois davantage, si plusieurs protéines nettement individualisées sont décrochées de la colonne par un même tampon.

Cette méthode a l'inconvénient d'être la plus longue et la plus fastidieuse. Il faut, en effet, que l'opérateur se tienne constamment auprès de la colonne, afin de changer de tampon au moment où le tampon précédent affleure à la surface de la cellulose, ceci afin de ne pas provoquer une interpénétration de deux tampons, réalisant une ligne de démarcation peu nette, entre les protéines éluées par des tampons distincts.

D'autre part, il faut toujours poursuivre le passage d'un tampon déterminé jusqu'à ce que le spectrophotomètre soit revenu à sa position de base, c'est-à-dire lorsque toutes les protéines entraînaibles par ce même tampon sont bien sorties de la colonne. Ceci est parfois assez long, lorsque la force ionique du tampon est telle, qu'elle correspond juste aux conditions d'élution d'une protéine homogène au point de vue chromatographique. On assiste alors à la formation d'un pic étalé, d'une traînée importante.

Nous verrons ultérieurement qu'une protéine dénaturée donne également un phénomène de ce genre, mais la forme de la courbe n'est dans ce cas pas la même. Par contre, on obtient une courbe analogue lorsque la colonne présente un phénomène de saturation. Nous y reviendrons.

Si au point de vue pratique, la méthode par gradient discontinu est la moins agréable à employer, elle présente néanmoins des avantages certains: dans les chromatographies préparatives, où l'on veut isoler une protéine, ou un groupe de protéines déterminées, il suffit de repérer pH et force ionique du tampon d'élution de cette protéine intéressante. Puis, on l'isole ensuite au moyen de deux tampons successifs, le premier éluant tout ce qui précède dans le chromatogramme, le second éluant la protéine recherchée de manière sélective.

b) ÉLUTION PAR GRADIENT CONTINU

C'est la méthode la plus couramment employée, sans doute parce qu'elle est la plus commode. Elle consiste à alimenter la colonne en tampon, à partir

d'une chambre de mélange, dont le volume peut être fixe ou variable communiquant avec un ou plusieurs réservoirs d'alimentation, dans lesquels on place un tampon de force ionique plus forte et de pH égal ou inférieur à ceux du tampon contenu dans la chambre de mélange. Un agitateur magnétique brasse doucement le contenu de la chambre de mélange, permettant d'obtenir un milieu homogène variable dans celle-ci. La colonne est ainsi alimentée avec un tampon de force ionique et de pH pouvant varier graduellement suivant une courbe qui dépend des conditions expérimentales.

CAS LE PLUS SIMPLE: GRADIENT LINÉAIRE

C'est celui où les deux chambres de mélange B et d'alimentation A, ont des volumes identiques V .

$$V_A = V_B = V$$

Comment varie le gradient du tampon d'alimentation au cours de la chromatographie? (fig. 3, page 37).

Si A et B ont une forme identique, lorsque A se vide dans B qui lui-même se vide dans la colonne, les niveaux dans A et B restent toujours les mêmes. Ils sont en équilibre hydrostatique. La concentration du tampon sortant du mélangeur sera donnée par l'équation :

$$C = C_o^A \frac{v}{V}$$

avec:

C: concentration du tampon en B
 C_o^A : concentration du tampon en A
 v : volume de liquide débité par B
 V : volume total de départ en B

Le gradient varie linéairement entre C et C_o^A . C'est le gradient le plus simple. Nous verrons qu'en fait, ce n'est pas celui qui présente le plus d'avantages.

GRADIENT DE FORME EXPONENTIELLE

Il est obtenu en fermant la communication de B avec l'atmosphère, de façon que le volume de B reste constant.

Dans ces conditions, soit V le volume des réservoirs, identique:

$$V_A = V_B = V$$

Prenons le cas le plus simple, dans lequel B ne contient aucun tampon au départ.

Soit:

C^B la concentration du tampon contenu dans le ballon B
 C_o^A la concentration du tampon en A au début de la chromatographie
 v le volume du tampon ayant pénétré dans le ballon B

Les conditions initiales sont telles que:

$$\text{au temps } t = 0 \quad v = 0 \quad C^B = 0$$

Dans le ballon B, la variation de C^B sera égale à la différence entre ce qui provient de A et ce qui sort de B, pour aller dans la colonne.

$$dC^B = C_o^A \frac{dv}{V} - C^B \frac{dv}{V} \quad (1)$$

Intégrons cette équation pour obtenir C^B , c'est-à-dire la concentration en tampon de B au cours de la chromatographie. Ceci nous donnera la composition du tampon alimentant la colonne.

Pour cela, l'équation (1) peut se mettre sous la forme:

$$\text{ou} \quad dC^B = \frac{1}{V} (C_o^A - C^B) dv$$

$$\text{soit} \quad \frac{dC^B}{C_o^A - C^B} = \frac{1}{V} dv \quad (2)$$

L'équation cherchée s'obtiendra en intégrant cette égalité :

$$-\text{Log} (C_o^A - C^B) = \frac{v}{V} + \text{Cte} \quad (3)$$

Calculons cette constante, en nous référant aux conditions initiales :

$$\text{si } t = 0 \quad v = 0 \quad C^B = 0 \quad \text{donc } -\text{Log } C_o^A = \text{Cte}$$

On peut écrire

$$\text{Log } C_o^A - \text{Log} (C_o^A - C^B) = \frac{v}{V}$$

Nous obtenons une relation entre C^B et v .

Remplaçons les logarithmes népériens par les logarithmes vulgaires :

$$\log \frac{C_o^A}{C_o^A - C^B} = 0,4343 \frac{v}{V}$$

soit en passant à la forme exponentielle

$$\frac{C_o^A}{C_o^A - C^B} = K e^{\frac{v}{V}}$$

$$\text{or si } v = 0 \quad C^B = 0 \quad e^{\frac{v}{V}} = 1 \quad \text{donc } K = 1$$

on peut écrire :

$$\frac{C_o^A}{e^{\frac{v}{V}}} = C_o^A - C^B$$

et

$$C^B = C_o^A \left(1 - \frac{1}{e^{\frac{v}{V}}} \right)$$

$$C^B = C_o^A \left(\frac{e^{\frac{v}{V}} - 1}{e^{\frac{v}{V}}} \right)$$

C'est l'équation cherchée, dont nous pouvons tracer la courbe, en prenant comme ordonnée la concentration C^B de tampon présent en B, et comme abscisse le volume v de tampon fourni par A. Ce volume varie entre $v = 0$ et $v = V$. Nous avons pris pour V une valeur arbitraire égale à 1 (figure n° 4, page 38).

Nous voyons sur cette courbe que l'accroissement de C^B va constamment en se ralentissant et tend, sans jamais l'atteindre, vers la valeur C_o^A . Elle atteint la valeur $C_o^A/2$ indiquant que la concentration en B est égale à la moitié de celle de A, vers la valeur 0,29 de V , en prenant conventionnellement le volume de V égal à 1.

CAS GÉNÉRAL. — Le plus souvent, le ballon B contient déjà au début de la chromatographie, un tampon de concentration C^B , soit :

C^B la concentration du tampon en B au cours de la chromatographie ;

C_o^B la concentration en B au temps $t = 0$.

Les conditions initiales sont telles que si $t = 0$ $v = 0$ $C^B = C_o^B$.

L'équation (3) du cas précédent, toujours valable, permet de calculer la constante, qui prend une nouvelle valeur telle que :

$$- \text{Log} (C_o^A - C_o^B) = \text{Cte}$$

en remplaçant dans (3) la constante par sa valeur :

$$\text{Log} \frac{C_o^A - C_o^B}{C_o^A - C^B} = \frac{v}{V}$$

soit en passant à la forme exponentielle :

$$C_o^A - C_o^B = (C_o^A - C^B) e^{\frac{v}{V}}$$

ou

$$C^B e^{\frac{v}{V}} = C_o^A e^{\frac{v}{V}} - C_o^A + C_o^B$$

soit

$$C^B = C_o^A - \frac{C_o^A}{e^{\frac{v}{v'}}} + \frac{C_o^B}{e^{\frac{v}{v'}}$$

$$C^B = C_o^A \frac{e^{\frac{v}{v'}} - 1}{e^{\frac{v}{v'}}} + \frac{C_o^B}{e^{\frac{v}{v'}}$$

C'est une équation homogène, pour laquelle on vérifie que $C^B = C_o^B$ lorsque $v = 0$.

Lorsque v augmente, le second terme tend vers zéro, et C^B tend vers la valeur C_o^A du premier terme, suivant des valeurs croissantes si la concentration C_o^A est supérieure à C_o^B , suivant des valeurs décroissantes dans le cas contraire.

La variation de concentration C^B est d'autant moins importante que C_o^B est voisin de C_o^A .

Dans le cas particulier où $C_o^A = C_o^B$, la concentration C^B reste constante. On peut utiliser cette possibilité lorsqu'on veut faire varier le pH sans modifier l'osmolarité. C'est le cas où A contient du tampon phosphate monosodique,

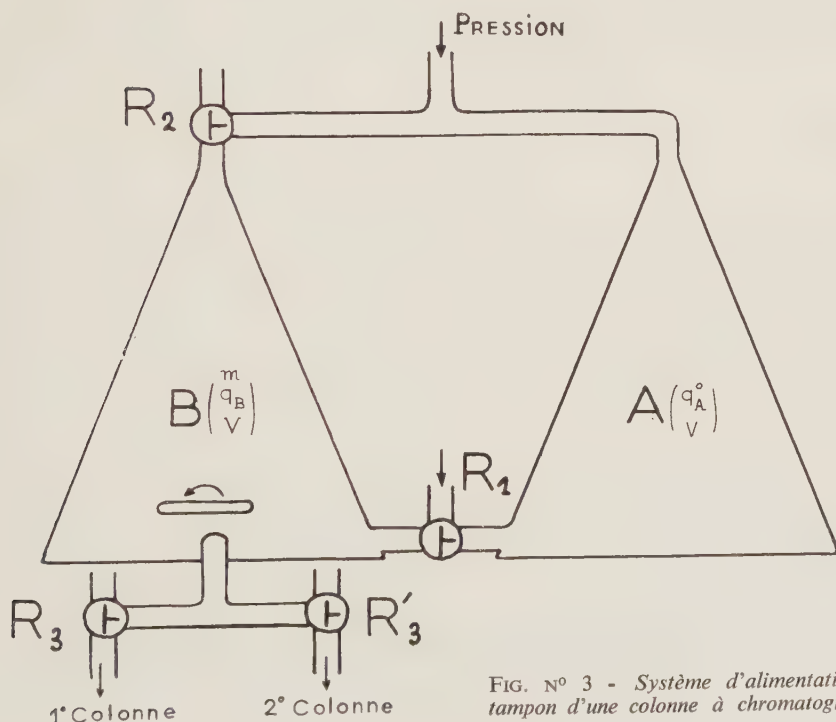


FIG. N° 3 - Système d'alimentation en tampon d'une colonne à chromatographie.

et B du tampon phosphate disodique. Le pH diminue sans variation d'osmolarité.

Il semblerait qu'avec ce système d'élution, la plupart des protéines devraient s'éluer en début d'expérience. En fait, nous verrons qu'en ce qui concerne les protéines sériques, le gradient de forme exponentielle convient mieux que le linéaire, car il permet mieux en particulier de séparer l'albumine des autres protéines au début du chromatogramme. Or c'est l'albumine qui gêne le plus considérablement la purification, lorsqu'on veut extraire le groupe γ - β globulines du reste des composants sériques.

AUTRES GRADIENTS

α) *Gradients successifs de forme exponentielle.* — Si dans le ballon A, on place successivement des tampons de force ionique croissante, chaque tampon donnera un gradient de forme exponentielle à l'entrée de la colonne. La résultante sera une succession de gradients de forme exponentielle. Ceci a été très utilisé, en particulier par FAHEY (28). Nous trouvons comme inconvénient à cette méthode de provoquer des variations brusques de concentration, à chaque changement de tampon, d'où une forme des pics du chromatogramme perturbé par ce phénomène, en particulier si une protéine homogène passe au moment d'un changement brutal de gradient, le reste de celle-ci peut être élué sous forme d'un pic qui flanque le premier, et on aura l'impression de deux protéines distinctes, là où il n'y en a qu'une.

On peut pallier cet inconvénient en coupant la communication entre A et B en ouvrant B jusqu'à ce que le spectrophotomètre soit revenu à une absorption nulle, avant de mettre le tampon suivant en A.

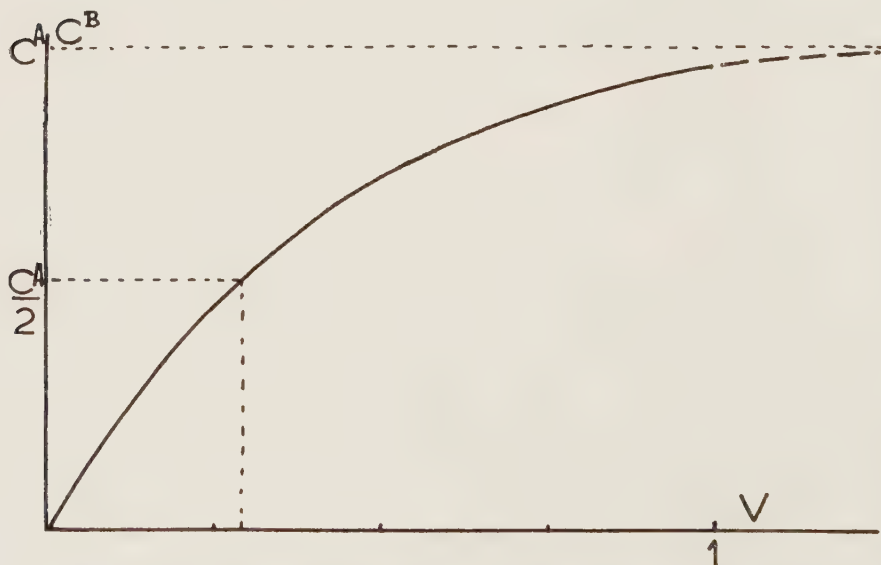


FIG. N° 4 - Variation de concentration du tampon d'élution de forme exponentielle.

Mais ceci oblige à une surveillance constante de la chromatographie — pour un bénéfice qui n'est pas apparent —. Nous avons pour cela très rapidement abandonné cette méthode.

Par contre, il existe une autre variante qui présente quelque intérêt, lors d'une première analyse d'un mélange de protéines, dont on ne connaît pas encore les caractéristiques : elle consiste à user d'un gradient continu et à surveiller l'apparition d'un pic, au spectrophotomètre. Lorsque celui-ci apparaît, on procède comme ci-dessus en coupant A de B. On poursuit ainsi l'élution avec un tampon de composition fixe, tant que se poursuit la sortie de protéines de la colonne. On repasse ensuite en gradient continu.

Ceci a l'avantage de permettre une meilleure séparation dans les cas d'une protéine quantitativement importante, nécessitant un volume d'éluant suffisant, et qui pourrait dans le cas où l'on n'arrêterait pas le gradient, être rejointe par les protéines s'éluant plus tardivement qu'elle.

β) Gradients variables à la demande

Dans le cas du gradient linéaire, on peut varier la forme et la capacité des réservoirs A et B. On peut obtenir ainsi toute une série de gradients : convexe, concave, biconvexe ou biconcave.

PETERSON et SOBER (75) ont également décrit un système à gradient variable qu'ils dénomment Varigrad, et qui permet au moyen de la combinaison de neuf récipients, communiquant entre eux, suivant toutes les combinaisons possibles, d'obtenir des gradients variant à l'infini. Si une solution de concentration C_0^A est placée dans une chambre qui soit ni la première ni la dernière du système, le gradient peut être déterminé empiriquement ou être calculé d'après l'équation suivante :

$$C^B = C_0^A \frac{(N-1)!}{(N-n)!(n-1)!} \left(1 - \frac{v}{V}\right)^{N-n} \left(\frac{v}{V}\right)^{n-1}$$

dans laquelle N est le nombre total de chambres du système et n le nombre de chambres qui contiennent C_0^A .

Mais ce dispositif est d'un emploi relativement complexe, et ne peut convenir à notre avis que dans des cas précis et pour une technique de routine. Dans le cas des protéines myélomateuses, auxquelles nous nous sommes intéressés, nous n'avons pas eu à employer un tel appareil.

5° Réalisation pratique.

Nous avons utilisé le système général décrit par FAHEY (75) auquel nous avons apporté quelques modifications de façon à le rendre plus maniable, et susceptible de donner tous les gradients que nous avions à utiliser : linéaire, exponentiel et mixte (fig. n° 3).

Un système de robinets R1, R2, R3, à trois voies, en téflon, permet le remplissage des deux réservoirs B et A successivement par R1, au moyen d'une ampoule à décanter située au dessus de l'ensemble et reliée à R1 par la voie en communication avec l'atmosphère.

Une légère pression s'avère nécessaire pour obtenir un débit suffisant. Celle-ci est fournie par une ouverture O, communiquant en permanence avec A, et à volonté avec B par l'intermédiaire de R2.

Pour obtenir un gradient linéaire, il suffit de faire communiquer B à A par R2. La pression est la même dans les deux réservoirs, et égale à celle de O. Les deux réservoirs se vident simultanément.

Un gradient exponentiel s'obtient en fermant R2 en plaçant celui-ci dans une position intermédiaire. L'écoulement se fera entre A et B par R1. B reste toujours plein. Si à un moment donné, on veut arrêter le gradient, on ferme R1. B est laissé ouvert par l'intermédiaire de R2, et en communication soit avec O, si l'on veut une pression, soit avec l'air atmosphérique.

Si l'on veut des gradients successifs, R1 permet de changer le tampon de A à volonté. Il suffit de mettre par R2, A en communication avec l'atmosphère (B restant fermé) pour pouvoir remplir A.

L'ensemble réservoir B colonne restera ainsi sous une certaine pression si l'on opère assez rapidement. Sinon on peut toujours fermer momentanément R3 en attendant que la pression soit rétablie.

Les robinets R3 et R'3 permettent de mettre 2 colonnes à chromatographie en communication soit avec le système d'alimentation, sous pression ou non, soit avec l'atmosphère.

On réservera à cet effet la voie du robinet qui se trouve dans le prolongement de la colonne, ceci afin de pouvoir utiliser cette voie pour une alimentation directe de la colonne, en particulier pour placer l'échantillon à analyser au début de la chromatographie, au moyen d'un cathéter monté sur une seringue.

Le fait d'avoir deux colonnes alimentées par un tampon identique permet de procéder à deux chromatographies simultanées, ce qui permet de comparer le comportement de deux sérums, l'un normal et l'autre pathologique par exemple. Cette technique a été utilisée pour la première fois par FAHEY (28) pour comparer sérum normal et sérum de leucémique.

A la sortie de la colonne, le liquide est dirigé dans un spectrophotomètre enregistreur LKB et analysé par une longueur d'onde de 2645 Å°. Ensuite on recueille l'éluat au moyen d'une fractionneuse automatique. Les fractions ont été calculées de telle sorte que leur volume soit égal à la moitié de celui de l'échantillon, lorsqu'il s'agissait de sérum : dans les autres cas, il a été calculé dans les mêmes proportions en fonction de la quantité de protéines mises en jeu.

Le pH est mesuré au moyen d'un pH mètre TACUSSEL.

La conductivité au moyen d'un pont à conductivité PHILIPS.

B) CONTROLE ÉLECTROPHORÉTIQUE DES FRACTIONS

a) CONCENTRATION

Les tubes contenant les fractions correspondant à un pic distinct sont rassemblés en une seule fraction. On ramène ensuite chaque fraction obtenue à un volume variant de un demi à cinq ml suivant la quantité de protéines contenue, quantité qui est appréciée en se basant sur l'importance du pic correspondant.

On utilise pour cela la technique classique de dialyse contre polyvinyl pyrrolidone en poudre, au moyen d'un boyau cellulosique. Cette méthode a l'avantage de soustraire non seulement l'eau, mais aussi les petits ions salins, dont les ions phosphate du tampon, à la solution de protéines.

On peut ainsi concentrer jusqu'à déshydratation presque complète de l'échantillon. Il ne reste plus qu'à dialyser contre sérum physiologique. Si on prend la précaution de malaxer le boyau cellulosique entre les doigts avant de récupérer le concentrat, afin de décoller toutes les protéines de la membrane, il n'y a pratiquement aucune perte. Il suffit d'opérer à une température de l'ordre de $+ 5^{\circ}\text{C}$ pour éviter la dénaturation et de reprendre le concentrat avec une quantité de sérum physiologique telle, que la concentration de la protéine étudiée dans la solution, soit compatible avec une étude électrophorétique, en particulier le gel d'amidon. C'est-à-dire que sa concentration soit au minimum de 8 à 10 g pour mille.

b) LES MÉTHODES ÉLECTROPHORÉTIQUES

L'étude chromatographique des protéines nécessite un système de référence quant à la détermination de leur nature. Nous avons employé les méthodes électrophorétiques qui, par recoupement, permettent, aidées de l'immuno-électrophorèse, de localiser une protéine avec précision.

1° *L'électrophorèse en veine liquide dite de TISELIUS.*

Permet une mesure précise de la mobilité. C'est un bon système de référence, qui a l'inconvénient cependant de nécessiter une quantité de sérum importante et de présenter un pouvoir de résolution relativement faible des protéines. Nous avons réalisé une électrophorèse de TISELIUS pour chaque sérum étudié.

2° *L'électrophorèse sur papier*

est la plus simple. C'est elle qui permet le diagnostic biologique du myélome, au cours des investigations cliniques. Elle est malheureusement imprécise, car la migration protéique est perturbée par les phénomènes d'évaporation, les phénomènes d'électro-endosmose, et par l'hétérogénéité même du papier. Nous ne l'avons pas utilisée dans ce travail, si ce n'est pour l'étude du sérum total.

En effet, en ce qui concerne les fractions obtenues par chromatographie, le papier pourrait donner de bonnes indications pour un repérage grossier, mais de toute façon reste très insuffisant pour une étude fine. Nous lui avons préféré l'électrophorèse en gélose, dont le pouvoir résolutif n'est pas supérieur, mais dont le maniement est plus rentable.

3° *L'électrophorèse en gélose* a en effet l'avantage d'être rapide. Nous nous en sommes servis pour un contrôle systématique des fractions obtenues. Nous avons utilisé la technique de WIEME (1955).

Pour un repérage fin des composants protéiques, nous avons utilisé comme référence de base l'immunoélectrophorèse et l'électrophorèse en gel d'amidon.

4° *L'immunoélectrophorèse de GRABAR et WILLIAMS* (43) a le grand mérite de préciser l'identité ou du moins la parenté chimique de deux protéines ou paraprotéines. Elle comporte cependant deux inconvénients : elle n'est absolument pas quantitative, et ses données varient avec l'antisérum utilisé. Nous avons utilisé une semi-microméthode intermédiaire entre celle de GRABAR et WILLIAMS et celle de SCHEIDEGGER, en utilisant une gélose en tampon véronal 0,05 M, placée dans un champ électrique de 4 v/cm, pendant un temps de migration de 3/4 d'heure environ, suivant les échantillons de gélose ; on coule 30 ml de gélose sur une plaque de 13 × 21 cm.

L'IMAGE IMMUNOÉLECTROPHORÉTIQUE. — Chaque protéine distincte des voisines au point de vue antigénique donne une ligne de précipitation avec l'antisérum correspondant. Nous avons employé les sérums équins anti-humains n° 223 et n° 224 de l'Institut Pasteur.

Mais il faut toujours avoir à l'esprit que le précipité ne se produit qu'à l'endroit où antigène et anticorps sont dans des proportions optimales. Un excès de l'un ou de l'autre des réactifs inhibe la précipitation, ou peut redissoudre un précipité déjà existant.

Nous rappellerons quelques données fournies par l'immunoélectrophorèse, et qui ont été utilisées dans ce travail :

a) MESURE DE LA MOBILITÉ RELATIVE DES CONSTITUANTS

On peut calculer la mobilité d'une protéine par rapport aux mobilités connues de deux autres protéines.

A partir d'un point de départ O arbitrairement choisi, sur le tracé, on peut calculer la mobilité M_x d'une protéine X d'après les mobilités M_a et M_b de deux protéines A et B :

$$M_x = M_a - (M_a - M_b) \frac{AX}{AB}$$

AX et AB étant les distances mesurées entre les milieux géométriques des arcs de précipitation des protéines A, X et B sur l'immunoélectrophorogramme.

On ne peut pas appliquer cette formule chaque fois que la migration de la protéine considérée est modifiée par le support de la gélose, c'est-à-dire :

— lorsque la protéine réagit avec la gélose : c'est le cas de la lipoprotéine lente, dont WIEME (1959) a montré l'accélération dans la gélose.

— lorsque la migration de la protéine est ralentie
par la grosseur de la molécule, comme dans le cas des macroglobulines ;

parce que la protéine a tendance à précipiter dans la gélose. C'est le cas des euglobulines et des cryoglobulines.

b) LECTURE DE LA LIGNE DE PRÉCIPITATION

Il est nécessaire de rappeler quelques données, à savoir :

— L'immunoélectrophorèse ne peut pas donner des résultats quantitatifs

dans l'analyse des protéines. On peut cependant avoir une idée des quantités protéiques mises en jeu, si l'on considère que:

— Un antigène est d'autant plus abondant que sa ligne de précipitation est plus proche du réservoir des anticorps. Ceci est important dans le cas des protéines anormales, quant à leur quantité, ou à leur propriété antigénique, ce qui est le cas des protéines myélomateuses. En effet, la précipitation antigène-anticorps ne se fait que dans rapports quantitatifs bien déterminés. Ceci fait que dans le cas d'antigènes trop concentrés par rapport à l'anticorps, la précipitation ne sera pas visible, par redissolution du précipité dû à l'excès d'antigène.

— C'est pourquoi l'intensité d'une ligne de précipitation mesure l'abondance d'un antigène, tant que celui-ci n'atteint pas une quantité telle qu'il se trouve en excès et redissout le précipité formé.

— Un antigène est d'autant plus abondant que sa ligne est moins courbe et que son poids moléculaire est plus faible.

— Enfin la ligne de précipitation est floue du côté opposé au réactif en excès. C'est en particulier le cas fréquemment rencontré dans les protéines myélomateuses, où l'on a un excès d'antigène. Il faut alors adapter les quantités d'antigène et d'anticorps à la protéine que l'on veut étudier, ceci pour avoir un trait de précipitation net.

c) MÉTHODES D'IDENTIFICATION D'UN TRAIT DE PRÉCIPITATION

Lorsqu'on isole une protéine, on obtient en immunoélectrophorèse un seul trait de précipitation. La comparaison de cet arc avec l'image immunoélectrophorétique d'un sérum témoin ne suffit pas toujours à identifier la protéine étudiée. Ce n'est en tout cas jamais un critère de certitude pour la nature de cette protéine, en particulier pour les protéines myélomateuses, qui n'ont pas toujours une mobilité correspondant à une protéine sérique normale.

Pour obtenir une certitude quant à la nature de la protéine étudiée, on peut utiliser:

— soit la méthode des gouttières interrompues, qui montre au niveau de l'arrêt de la gouttière contenant l'antisérum la fusion de l'arc de précipitation de la protéine étudiée avec l'arc de la protéine semblable du témoin.

— soit la méthode maintenant bien connue d'OUCHTERLONY (1949) qui permet de comparer deux protéines en les laissant diffuser contre un même antisérum, à partir d'un réservoir de départ différent.

Deux antigènes différents donnent deux traits de précipitation croisés.

Deux antigènes immunologiquement identiques donnent un trait unique par fusion des deux traits de précipitation.

Deux antigènes ayant en commun un ou plusieurs déterminants antigéniques, donnent un aspect intermédiaire: les deux arcs de précipitation sont distincts mais ont une branche de raccord partiel.

D'autres méthodes d'identification ont été employées en particulier par HEREMANS (50), ELLIOTT et OSSERMAN (72). Nous n'avons pas eu l'occasion de les employer au cours de ce travail.

d) FAUX TRAITS DE PRÉCIPITATION

On obtient parfois des traits de précipitation aberrants, qu'il faut savoir éviter :

- si l'on place de l'antisérum en plusieurs fois dans la gouttière;
- si un antigène est en grand excès, il peut franchir la gouttière contenant l'anticorps, neutraliser celui-ci et fournir un trait de précipitation, qui se poursuit sur le tracé voisin;
- dans le cas de sérums ayant subi une attaque enzymatique ou bactérienne, du fait de leur vieillissement ou de leur séjour trop prolongé à la température du laboratoire, il se produit une dégradation des protéines, dont les produits de dégradation peuvent donner des arcs de précipitation supplémentaires. En particulier on peut observer un arc de mobilité légèrement supérieur à celui des γ globulines, se raccordant à lui suivant une courbe qui lui reste extérieure par rapport à la ligne de migration des protéines.

5° *L'électrophorèse en gel d'amidon.*

Le support est fourni par un gel provenant d'amidon partiellement hydrolysé. Aux critères électriques habituels s'ajoute ici le fait que ce gel présente une structure en réseau, entre les mailles duquel migrent les molécules protéiques. On a donc une séparation supplémentaire où interviennent la grosseur et l'encombrement stérique de la molécule. Les très grosses molécules sont arrêtées. C'est ainsi que la β_2 M physiologique et la macroglobuline pathologique restent dans la fente d'inclusion.

La fabrication du gel est réalisée suivant la méthode de SMITHIES (93) modifiée par FINE (34). Le tampon utilisé a été le tampon soude-acide borique de pH 8,4. Dans le cas de l'étude de l'hétérogénéité des protéines myélomateuses, du type β , on a également utilisé pour la confection du gel un tampon au véronal (tampon de DURRUM) ou un tampon au borate additionné de thioglycollate de sodium 0,01 M (16) suivant les indications de SMITHIES (93).

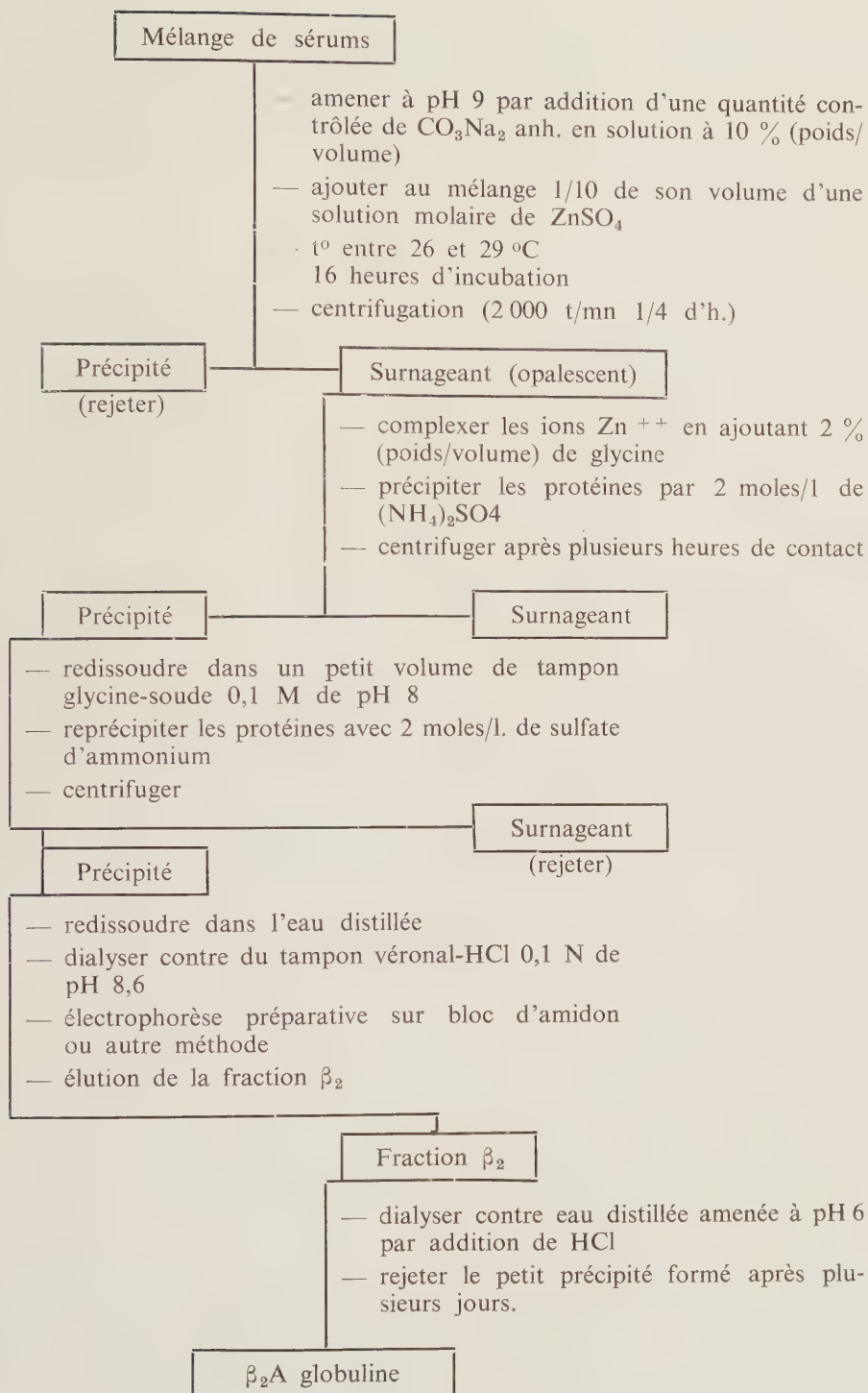
6° *Analyse immunologique à partir d'une électrophorèse en gel d'amidon.*

Elle a été proposée par SMITHIES (1955) et POULIK (1959). Plus complexe que la précédente, cette méthode a l'avantage de fournir un tracé immunoélectrophorétique obtenu à partir d'une séparation protéique plus fine, et différente de celle obtenue en gélose. Nous l'avons utilisée pour l'étude de l'hétérogénéité des protéines myélomateuses.

7° *Méthodes employées pour la préparation de fractions enrichies en vue de la chromatographie.*

a) PRÉPARATION DE LA β_2 A GLOBULINE

Nous avons employé la méthode de préparation préconisée par HEREMANS (50) au sulfate de zinc, dont voici les divers temps :



Le rendement de cette méthode est peu satisfaisant, et se situe vers 10 %, ce qui est un gros inconvénient. A un accroissement du rendement correspond une diminution dans la spécificité du fractionnement. Ce handicap n'est que relatif, en ce qui concerne la préparation de β 2A physiologique, car nous pouvions partir d'une grande quantité de sérum. Dans le cas de β 2A de nature myélomateuse, le problème est différent. Nous avons utilisé une préparation au sulfate d'ammonium à 1,8 M.

b) PRÉCIPITATION PAR LE SULFATE D'AMMONIUM 1,8 M

Huit à dix millilitres de sérum sont additionnés d'eau distillée jusqu'à un volume de 100 ml. On verse le tout aussitôt dans 100 ml de sulfate d'ammonium 3,6 M en brassant énergiquement. La solution est laissée au repos dans une éprouvette à la température du laboratoire plusieurs heures, puis placée à 4 °C une nuit. Le précipité est recueilli par centrifugation, lavé, redissous dans du sérum physiologique et dialysé contre eau physiologique pour éliminer ce sulfate d'ammonium, pendant deux ou trois jours. Le surnageant est dialysé à + 4 °C, contre eau courante, une nuit, concentré contre polyvinyl-pyrrolidone et dialysé contre eau physiologique pendant deux ou trois jours.

c) ÉLECTROPHORÈSE SUR COLONNE D'AMIDON OU DE CELLULOSE

Cette méthode a l'avantage d'opérer sur des quantités de sérum relativement importantes, de l'ordre de 5 ml et d'obtenir des fractions de mobilité connue, et surtout identique pour toutes les molécules protéiques qui constituent une fraction donnée, alors que tel n'est pas le cas pour la précipitation chimique. D'autre part cette méthode a l'avantage de ne pas être très dénaturante (en particulier pour les complexes éventuellement formés par les protéines entre elles. Nous avons réalisé pour cela une colonne verticale, de 4 $\times$ 40 cm, dont le montage est semblable à celui employé par l'école de TISELIUS.

DEUXIÈME PARTIE

Comme l'indique le titre de ce travail, nous nous sommes attachés surtout à l'étude de l'hétérogénéité d'une fraction pathologique, isolée à partir de ce qu'avec HEREMANS on a tendance à considérer actuellement comme constituant les globulines du « Système gamma ».

I. LES GLOBULINES DU SYSTÈME GAMMA

Comme, dans notre introduction, nous y faisons allusion, le pic γ tel que le définit TISELIUS par électrophorèse libre, a été depuis démembré en un certain nombre de constituants, dont on en compte six actuellement, ce qui a conduit HEREMANS (49) à parler non plus de γ globulines, mais de système gamma.

Que faut-il entendre par là ?

Le terme de γ globulines, défini par TISELIUS d'après sa mobilité, est aujourd'hui l'objet de nombreuses controverses, dues au fait que ce pic γ renferme en réalité tout un ensemble de groupes moléculaires dont le nombre n'a fait qu'augmenter depuis la première séparation électrophorétique de TISELIUS.

On a primitivement donné aux γ globulines la valeur d'anticorps. Le fait qu'un même individu possède tout un spectre d'anticorps, peut ainsi expliquer l'hétérogénéité que présente déjà le pic γ de TISELIUS. Mais le problème se complique lorsqu'on s'aperçoit que les anticorps ne sont pas tous localisés dans ce pic. D'autre part, l'immunoélectrophorèse montre que l'arc de précipitation des γ globulines se prolonge au niveau de ce qui correspond au pic β de TISELIUS, et même jusqu'au niveau des α globulines.

Enfin on s'est aperçu que d'autres protéines ne possédant pas la fonction anticorps participaient également à la formation du pic γ , et même à l'arc γ de l'immunoélectrophorèse. L'étude du problème fut facilitée lorsque COHN et son école mirent au point la méthode de fractionnement du plasma par l'éthanol.

A la suite de DEUTSCH (1946), on distingue dans les γ globulines de TISELIUS, les globulines γ et γ_2 , nomenclature encore utilisée actuellement par certains auteurs américains et dans laquelle γ_2 représente les γ globulines les plus rapides.

De la même manière, COHN et coll. employait le terme de β_2 globulines pour désigner tout sommet se trouvant entre les pics β et γ à l'électrophorèse libre. Ce terme de β_2 globulines pouvait donc englober un nombre non défini de constituants, puisqu'il correspondait à un ensemble de protéines ayant toutes la même mobilité. Ce terme de β_2 globulines persista ensuite dans la

littérature lorsque l'immunoélectrophorèse décomposa la région β_2 en un certain nombre de constituants qui devinrent, entre autres, les globulines β_2 A et β_2 M.

L'APPORT DES MÉTHODES DE FRACTIONNEMENT DU PLASMA permet encore à ONCLEY et coll. (1949) d'isoler par la technique de fractionnement à l'éthanol ou méthode 9 de COHN, les fractions $\Pi_{1,2}$ et Π_3 .

SCHULTZE (1952) utilisant une méthode de fractionnement au sulfate d'ammonium isole une fraction homogène par cette technique. L'immunoélectrophorèse montra par la suite que la méthode 9 de COHN donnait une fraction correspondant à la fraction 7S des γ globulines, alors que la fraction de SCHULTZE correspondait au composé 19 S, c'est-à-dire à la β_2 M globuline.

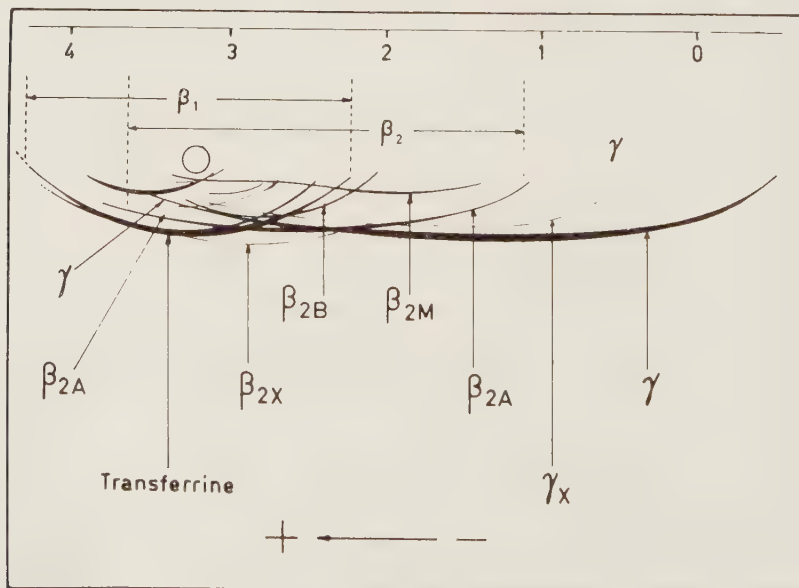
Ces deux méthodes sont considérées comme marquant un stade important dans la séparation des globulines sériques, dans la zone de mobilité 2,5. En effet, la première est à la base de la technique industrielle de préparation des γ globulines par fractionnement du plasma. La seconde permet d'isoler cette protéine β_2 M ou macroglobuline, dont on pensait qu'elle était l'apanage de la maladie de WALDENSTRÖM.

Mais on isola par la suite d'autres constituants tels que la β_2 A globuline en 1958, les globulines β_2 B, β_2 X, γ_x de la nomenclature d'HEREMANS, ces trois dernières mises en évidence par immunoélectrophorèse.

a) APPORT DE L'IMMUNOÉLECTROPHORÈSE

Il faut citer à ce propos les travaux de WILLIAMS et GRABAR (1953), SCHEIDEGGER, MARTIN et RIOTTON (1956), BURTIN (1957), HARTMANN et coll. (1957), SCHEIDEGGER et BUZZI (1957).

HEREMANS (50) donne de l'image immunoélectrophorétique de la région β_2 le schéma suivant :



(d'après HEREMANS)

Signalée par SCHEIDEGGER (1957) la globuline β_2 B n'est mise en évidence que dans le sérum frais, elle est liée à la consommation du complément.

La globuline β_2 X a été mise en évidence par HEREMANS en 1959. Sa nature n'est pas encore connue à l'heure actuelle. Sa mobilité est de l'ordre de 2,70, elle apparaît à l'immunoélectrophorèse de sérums pathologiques et n'est pas révélée par tous les anti-sérums anti-globulines humaines.

La protéine responsable de la ligne γ_x est identique à celle qu'en 1930 TILLET et FRANCIS appelèrent la « C réactive protéine » (C. R. P.), et qu'ils mirent en évidence dans le sérum de malades atteints de pneumonie à pneumocoques. Par la suite, on s'aperçut qu'il ne s'agissait pas d'un anticorps antipneumococcique spécifique, mais que son apparition était liée à tout processus inflammatoire ou infectieux. Elle serait le support du pouvoir anti-complémentaire d'un sérum. Enfin il n'y a pas de relations antigéniques entre la γ_x et le groupe des globulines γ , β_2 A et β_2 M qui nous intéressent.

C'est d'ailleurs à ces trois protéines que nous allons maintenant nous limiter.

On ne saurait dissocier l'étude de la β_2 A globuline normale et pathologique de celle des deux autres, avec lesquelles elle forme un ensemble ayant une caractéristique commune. Ces globulines sont toutes les trois le support des anticorps, d'où le terme d'immunoglobulines qui les désigne. Enfin et surtout, ces trois globulines que leur fonction rapproche ont une origine cellulaire commune, réticulolymphocytaire, — que le rôle de leur synthèse soit dévolu aux éléments plasmocytaires ou aux éléments lymphocytaires, cela ne change rien au fait qu'à une famille cellulaire correspond une famille protéique, à l'état normal comme à l'état pathologique.

La clef du problème est au niveau cellulaire, là où se produit la synthèse de ces immunoglobulines. La β_2 A n'est qu'une partie un peu artificiellement individualisée par l'immunoélectrophorèse. C'est pourquoi nous avons tenu à ne pas la séparer de son contexte.

b) APPORT DE L'ÉLECTROPHORÈSE EN GEL D'AMIDON

Cette méthode ne permet de mettre en évidence aucune séparation de constituants différents de ceux que l'on trouve à l'immunoélectrophorèse. Mais, l'électrophorèse en gel d'amidon présente, néanmoins, un intérêt, en ce qui concerne la β_2 M globuline. Cette macroglobuline a, en effet, un poids moléculaire tel, que son encombrement stérique est suffisant pour l'empêcher de migrer à travers le réseau du gel d'amidon. Aussi, reste-t-elle dans la fente d'inclusion. On ne la retrouve nulle part sur le tracé électrophorétique et ceci permet, par exemple, de la distinguer d'une protéine myélomateuse, qui, elle, apparaît sur le tracé.

D'autre part, γ globulines et β_2 A présentent en gel d'amidon un certain degré d'hétérogénéité, sur lequel nous reviendrons ultérieurement.

Certains auteurs ont pu penser que la β_2 A globuline avait en gel d'amidon une mobilité supérieure à celle de l'albumine. Il semble s'agir d'un artefact dû à la méthode d'extraction par électrodialyse à partir du gel d'amidon, après migration. Cette méthode provoquerait une dénaturation de la protéine.

Or on sait qu'une faible dénaturation peut considérablement ralentir la migration des protéines dans le gel, probablement en déroulant l'hélice α qui constitue la structure habituelle de celles-ci.

Cette dénaturation donnerait alors en immunoélectrophorèse un arc de précipitation de mobilité analogue à celui de la β_2 A globuline d'où la confusion possible. Quoi qu'il en soit, on admet aujourd'hui que la β_2 A globuline a une mobilité de β_2 en gel d'amidon comme dans tous les milieux.

II. LE PROBLÈME DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DES GLOBULINES DU SYSTÈME GAMMA, TELLES QUE LES DÉFINIT L'IMMUNOÉLECTROPHORÈSE

Les globulines du système gamma telles que les définit HEREMANS ne sont des entités protéiques bien définies que si l'on s'en réfère à l'immuno-électrophorèse. Mais, les autres méthodes mettent en évidence une hétérogénéité manifeste de ces trois globulines, et les recherches tendent actuellement vers l'étude analytique de ce qui représente une protéine immunologiquement pure.

1° Les γ globulines.

Elles représentent déjà un pic légèrement dissymétrique et aplati lors de l'électrophorèse libre de TISELIUS. Des nombreux travaux relatifs à l'hétérogénéité des protéines, nous avons essayé de tirer une synthèse, en classant ceux-ci d'après la méthode d'étude employée, mis à part les résultats fournis par la chromatographie sur cellulose, qui fera l'objet d'un chapitre spécial.

L'ultracentrifugation effectuée par l'ultracentrifugeuse analytique SPINCO montre une constante de sédimentation de 6,5 S pour S_{20}^{w} . Environ 1 % de la fraction γ du sérum normal est constituée d'un composant 19 S qui plus tard fut identifié à la β_2 M ou macroglobuline. Comme dans le cas de l'albumine une seconde population de molécules protéiques a été retrouvée après précipitation par les méthodes à l'éthanol sous forme d'agrégats qui ont une constante de sédimentation de 9S-10S et représenteraient un dimère.

Ces agrégats seraient bien le résultat du traitement par l'éthanol, car ils sont absents ou en très faible quantité dans les préparations obtenues par séparation électrophorétique, par exemple en gel d'amidon.

On admet actuellement, en partant de ces données, un poids moléculaire de $160.000 \pm 5 \%$, qui serait sujet à caution (86) parce que les autres méthodes de séparation mettent en évidence une microhétérogénéité dans ce composant γ globulinique de constante de sédimentation égale à 6,9 S.

L'électrophorèse en gel d'amidon permet de retrouver les γ globulines sous l'aspect d'une plage étendue de part et d'autre de la fente d'inclusion. On retrouve là la microhétérogénéité déjà constatée. Cette microhétérogénéité est rendue manifeste si l'on pratique une étude immunologique à partir du tracé ainsi obtenu en gel d'amidon (18) (DEBRAY et SACHS, ANTOINE et FINE, 1961). Cette hétérogénéité se traduit par un précipité extrêmement étendu de part et d'autre de la fente d'inclusion. Ceci met bien en évidence le fait

suivant lequel la constatation d'une antigénicité unique dans une fraction, reste une condition nécessaire pour affirmer qu'une fraction ne comprend qu'un seul constituant, mais ne constitue pas en elle-même une condition suffisante pour affirmer que la fraction n'en comprend qu'un seul.

Les caractères antigéniques des γ globulines sont bien étudiés par l'hydrolyse enzymatique. La trypsine et la chymotrypsine ont permis à LAPRESLE, KAMINSKI, TANNER (60) ainsi qu'à HANSON (44) de scinder les γ globulines sous forme de deux constituants donnant un dédoublement de l'arc de précipitation des γ en immunoélectrophorèse, constituants différents suivant que l'on emploie l'un ou l'autre de ces enzymes.

BURTIN (9), au moyen de ces mêmes enzymes, obtient plusieurs lignes de précipitation, en nombre variable suivant les immunsérums. Ces lignes de précipitation lui permettent d'individualiser les différents déterminants antigéniques portés par la molécule intacte. Parmi ceux-ci, on trouve ceux qui correspondent à la protéine de Bence Jones du premier et du deuxième groupe. Ceci permet d'intégrer les paraprotéines myélomateuses dans le système gamma. Nous y reviendrons. Le nombre minimum de déterminants antigéniques des γ globulines serait égal à 7.

Mais c'est par la papaine que l'hydrolyse enzymatique des γ globulines a donné les résultats les plus intéressants. PORTER (78) PUTNAM (85) montrent après hydrolyse à la papaine de γ globulines humaines et de lapin, l'obtention de fragments 3,5 S correspondant à la moitié de la structure de la molécule mère.

Ils obtiennent des résultats identiques avec la γ globuline de lapin, mais obtiennent trois fractions au lieu de deux, la troisième pouvant elle-même être résolue en trois sous-fractions. Ils obtiennent enfin l'identification de trois fractions, par chromatographie, suivie d'une immunodiffusion en gel d'amidon, qui sépare la fraction III en ses trois sous-fractions. Les fractions I et II sont immunologiquement parentes, alors que la fraction III est immunologiquement distincte. MANDY, RIVERS et NISONOFF (70) montrent qu'on peut recombinaison les fractions I et II en un composé 5 S de PM voisin de 100.000, la liaison étant effectuée par des ponts disulfures. Ceci concorde avec les observations de NISONOFF (1960) (70) montrant que les γ globulines humaines sont dégradées en subunités 3,5 S par les actions successives de la pepsine et d'un agent réducteur.

HSIAO et PUTNAM (1961) arrivent au même résultat au moyen de l'hydrolyse par la papaine de γ globulines de diverses espèces. BURTIN (1960) dénombre au moins 7 constituants différents par hydrolyse enzymatique ménagée. Mais, c'est par l'étude d'une population de Lapins « ROKI TIVICA » que DUBISKI et KELUS (1961) ont peut-être apporté les données les plus intéressantes quant à la mise en évidence de l'hétérogénéité au point de vue antigénique de γ globulines. En étudiant les protéines de mobilité électrophorétique γ ils purent distinguer 5 antigènes différents qu'ils appellent ABCDE avec 32 combinaisons possibles entre ces antigènes; 8 de ces combinaisons furent retrouvées.

Si nous avons dû retracer aussi brièvement que possible cette longue énumération de travaux tendant à cerner de plus près l'hétérogénéité de l'arc immunologique γ , c'est afin d'établir les bases d'études immunologiques de la plus importante des immunoglobulines. Ceci va nous permettre de passer maintenant à l'étude de la protéine qui nous intéresse: la β_2A globuline.

2° La β_2A globuline.

Elle fut dénommée ainsi par GRABAR et WILLIAMS qui dès 1953 la mirent en évidence dans le tracé immunoélectrophorétique. Elle est bien connue depuis 1954, par la thèse de WILLIAMS. C'est BURTIN et coll. (1957) qui proposèrent le terme de β_2A . C'est une globuline qui est absente ou en tout cas très diminuée au point de vue quantitatif dans le sérum du nouveau-né, de l'agammaglobulinémique, présente en abondance dans le colostrum humain.

C'est à HEREMANS (50) qu'on doit la préparation de cette globuline, dont la séparation est basée sur la constatation de la haute résistance à la précipitation par les ions zinc de cette protéine. Comme pour les γ globulines, les travaux tendent à démontrer actuellement l'hétérogénéité de la β_2A globuline.

L'ultracentrifugation montre pour la constante de sédimentation de la β_2A une valeur de 7 S, similaire de celle de la γ globuline. Un second pic 10,5 S moins important flanque le premier. Artefact dû à la préparation? Polymère d'une subunité de β_2A ? Nous n'avons rien trouvé dans la littérature à ce sujet.

Si l'immunoélectrophorèse la montre sous forme d'un arc de précipitation unique, l'électrophorèse en gel d'amidon montre déjà une microhétérogénéité. Comme pour les γ globulines, l'image de la β_2A en gel d'amidon est imprécise, quant à ses limites, et donne l'apparence d'une traînée.

Les caractères antigéniques semblent moins hétérogènes que pour les γ globulines. Rien encore ne semble avoir été écrit en ce qui concerne les différents motifs antigéniques de la β_2A . Par contre, et ce fait est capital, HEREMANS (1959) (50) a pu montrer à partir de β_2A globuline préparée par ses soins, une communauté antigénique partielle avec les γ globulines, faible chez l'homme, beaucoup plus marquée chez le lapin. SCHEIDEGGER et BUZZI (1959) ont confirmé ces résultats.

La β_2M globuline de constante de sédimentation 19 S est la dernière des trois globulines du système γ , nous intéressant directement. Une communauté antigénique partielle avec les γ globulines est actuellement admise (FRANKLIN et THORBECKE 1961) — SCHEIDEGGER et BUZZI (1959) (88) ont également trouvé une communauté antigénique partielle avec la β_2A globuline. Enfin, comme γ et β_2A globulines, la β_2M est le support de nombreux anticorps, tels qu'agglutinines froides, isoagglutinines de types ABO et Rhésus comme l'ont montré GORDON (1953), CAMPBELL (1955), PEDERSEN (1945).

C'est à la suite de la constatation de ces similarités entre γ , β_2A et β_2M globulines, similarités de nature et de fonction que HEREMANS (1959) a proposé pour les désigner le terme d'immunoglobulines. De nombreuses observations effectuées dans le cas de paraprotéines concordent avec une telle vue du problème.

III. L'HÉTÉROGÉNÉITÉ ÉLECTROPHORÉTIQUE DES PARAPROTÉINES RATTACHÉES IMMUNOLOGIQUEMENT A LA β_2 A GLOBULINE

Le pic électrophorétique caractéristique du myélome en électrophorèse libre ou sur papier, a été attribué au fait que les protéines qui le composent étaient homogènes au point de vue de leurs charges électriques.

a) L'apport de l'électrophorèse sur papier à l'étude de l'hétérogénéité des paraprotéines est très faible à cause de son faible pouvoir de résolution. Rares sont les travaux qui font état d'une hétérogénéité sous forme de 2 constituants (WALDENSTRÖM 1952) et (OWEN 1956) ; AURELL (1961) distingue les myélomes à un composant, à deux composants proches, à deux composants dont un est large et l'autre ne l'est pas. Plus rarement encore ont été signalés trois composants (PETERMANN et coll. 1956).

b) L'ultracentrifugation, par contre, a pu enrichir nos connaissances en ce domaine, montrant qu'une globuline myélomateuse apparemment homogène, à l'électrophorèse, était en fait composée de molécules de différentes tailles à l'ultracentrifugation. Divers auteurs (PUTNAM et UDIN 1953, SMITH et coll. 1955, CREYSEL et coll. 1958) ont ainsi montré dans le sérum la présence de constituants de constante de sédimentation plus élevée que celles des γ globulines normales, et égale à 9 S, 11 S et 13 S. JANKE et SCHOLTAN (1955) en font une macroglobuline atypique. BAILLEUX et IMOHF (2) (1961) font de ces constituants voisins de la macroglobuline 18 S, et situés entre 8 et 12 S, une forme atypique de la β_2 A paraprotéine, et se demandent s'il ne s'agirait pas d'une nouvelle entité immunologique. LAURELL (1961), par ultracentrifugation, distingue deux types de protéines myélomateuses rattachés immunologiquement à la β_2 A globuline. Le premier correspond au β_2 A myélome, le second, qui possède comme constituant le plus lourd, un constituant 9 S appelé Z 1, devrait être rattaché aux γ globulines telles que les montre l'ultracentrifugation.

Mais si elle donne une idée de la pluralité des protéines β myélomateuses, l'ultracentrifugation ne donne aucun renseignement sur leur nature.

c) L'immunoélectrophorèse, par définition, ne donne qu'un arc de précipitation dans les β myélomes puisque la β_2 A globuline myélomateuse est définie à partir de sa parenté immunologique avec la β_2 A globuline normale.

d) L'électrophorèse en gel d'amidon, par contre, par son pouvoir résolutif important est d'un grand secours dans l'étude de l'hétérogénéité des paraprotéines β myélomateuses, vis-à-vis de molécules ayant des dimensions différentes. En gel d'amidon, la migration dépend théoriquement du maître couple de la protéine, et de ses cotes extrêmes. En fait, on sait seulement, parce qu'on le constate expérimentalement, que la vitesse de migration décroît lorsque le poids moléculaire augmente. Les molécules suffisamment

importantes ne pénètrent pas dans le gel, c'est pourquoi on distingue la macroglobuline β_2M par le fait qu'elle reste dans la fente d'inclusion, comme l'ont montré SILBERMAN et ENGLE (1957), fait qui a été confirmé par CREYSEL et FINE (1958) STEEL (1959).

C'est SILBERMAN (1958) qui le premier souligna l'existence en gel d'amidon de plusieurs composants anormaux dans le sérum de certains myélomes. Deux types sont mis en évidence : un type A montre cinq composants du côté cathodique du point d'insertion, en tampon borate, tandis qu'en tampon véronal on n'en observe qu'un. Un type B montre pour les deux tampons deux constituants proches de la fente d'inclusion et situés du côté anodique.

LAURELL (1961) montre qu'un certain nombre de « M components » ne pénètrent pas dans le gel, ou ne pénètrent qu'en partie, bien que n'étant pas constitués par une macroglobuline β_2M . Au total, il y aurait 37 % de « M components » présentant des signes d'hétérogénéité.

Comment se répartissent ces cas d'hétérogénéité par rapport à la définition immunologique de ces protéines ?

Celles qui sont immunologiquement des γ globulines sont rarement hétérogènes en gel d'amidon. BINETTE et SCHMIDT (1961) trouvent cinq types d'hétérogénéité dans la bande des γ globulines, mais dans les affections autres que le myélome. Par contre, les paraprotéines de type β_2A myélomes présentent fréquemment une très nette hétérogénéité, comme l'ont montré divers auteurs (FINE et CREYSEL 1961).

CREYSEL et coll. (1962) montrent que cette hétérogénéité est fréquente. Sur 37 cas de β_2A myélome, 18 présentent une série de fractions étagées de la fente d'inclusion à la zone immédiatement en arrière de la « β_c » de SMITHIES, fractions habituellement au nombre de 4 et d'allure analogue à celle que montre l'haptoglobine du type 1-1.

Dans 4 cas, l'hétérogénéité est moins caractéristique, constituée souvent par une fraction quantitativement importante flanquée d'un deuxième constituant beaucoup moins abondant. Les autres cas présentaient un constituant paraprotéinique unique.

Ces diverses fractions isolées par électrophorèse préparative en gélose montrent toutes une identité immunochimique totale avec la β_2A globuline. La méthode d'Ouchterlony permet de les différencier de l'haptoglobine. Enfin, il faut signaler que, comme l'ont montré ONEN, GOT et SILBERMAN (1958) pour les γ globulines, cette hétérogénéité disparaît si l'on utilise le tampon au véronal au lieu du tampon borate dans la confection du gel.

TROISIÈME PARTIE

I. APPORT DE LA TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE A L'ÉTUDE DES IMMUNOGLOBULINES

L'étude des protéines sériques par chromatographie sur cellulose, à la suite du travail princeps de PETERSON et SOBER (1956) a quelque peu été retardée par un défaut de cette méthode de séparation. Elle ne donne en effet aucune image des fractions obtenues. Il a donc fallu attendre l'essor de l'immunoélectrophorèse et de l'électrophorèse en gel d'amidon pour avoir des méthodes de référence permettant le contrôle des protéines des fractions délivrées par la colonne.

Il fallut attendre pour cette raison plusieurs années avant que cette méthode ne donne des résultats productifs.

Depuis trois ans environ, la littérature abonde en travaux sur le fractionnement des protéines sériques par les celluloses modifiées.

Mais, les conditions expérimentales de fractionnements ne sont pas toujours comparables, en particulier les tampons d'élution utilisés sont rarement identiques. Ceci ne permet pas une coordination aisée des résultats. Par recouplement de différents fractionnements effectués, on peut toutefois arriver à des conclusions assez précises en ce qui concerne les immunoglobulines.

1° Les γ globulines.

A. DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

Toutes les méthodes utilisant le tampon phosphate sur DEAE cellulose donnent des résultats similaires en ce qui concerne les γ globulines 6,6 S. Celles-ci passent en début de chromatogramme, facilitant ainsi leur repérage. L'étude de la littérature permet de réaliser la synthèse suivante des différents travaux :

Lorsqu'on utilise un tampon phosphate de départ de pH égal ou inférieur à 6, avec une molarité en phosphate de 0,02 M, on constate un passage des γ globulines en début de chromatogramme (11). A un pic nettement accentué, succède une série d'élutions contenant un faible pourcentage de γ (par électrophorèse sur papier) mêlé à des β globulines.

Quand on utilise, comme le font la majorité des auteurs, (TOMBS, COOKE, BURSTON et MACLAGAN 1960 ; FAHEY et HORBETT 1957, 1959, 1960 ; GOODMAN, DE VAUX ST-CYR 1960) un tampon phosphate de départ de pH égal

ou supérieur à 8 et une molarité en phosphate inférieure ou égale à 0,01 M, alors on met en évidence une certaine hétérogénéité de γ globulines.

Après un passage quantitatif important entre 5 à 15 % du chromatogramme, suit une continuelle élution de composants de 6,6 S immunologiquement rattachés aux γ globulines. Ceci montre donc cette hétérogénéité manifeste des γ globulines 6,6 S, hétérogénéité qui est mise en évidence également par électrophorèse sur papier et par immunoélectrophorèse. On constate que la mobilité des γ globulines obtenues dans les fractions successives croît régulièrement, de telle sorte que l'étalement des γ globulines dans le chromatogramme ne peut être attribué à un artefact.

Une autre preuve en est fournie par FAHEY et HORBETT (27), une deuxième chromatographie effectuée sur des fractions successives γ globuliniques d'un premier chromatogramme montre que l'on obtient la même image d'élution qu'au premier chromatogramme si l'on superpose les pics obtenus par la 2^e chromatographie.

L'hétérogénéité des γ globulines a été aussi étudiée par chromatographie en ce qui concerne les fragments obtenus après hydrolyse enzymatique de la molécule γ 6,6 S. C'est ainsi que PUTNAM (1962) (86), chromatographie les fractions obtenues par hydrolyse des γ globulines de lapins au moyen de la papaïne. Il procède en expérimentant au moyen d'une hydrolyse de durée variable et étudie à chaque fois les fractions obtenues par passage sur DEAE et CM cellulose. Il obtient un pic unique au départ, par contre, au cours du temps le nombre et la forme des pics obtenus varient.

Toutes ces données concourent à prouver l'hétérogénéité des γ globulines, hétérogénéité qu'on peut mettre en évidence par l'étude physicochimique des fractions obtenues.

B. TRAVAUX PERSONNELS

Lorsque nous avons mis en route au laboratoire la technique chromatographique sur cellulose modifiée, il nous a paru nécessaire de contrôler notre technique par l'étude de quelques cas simples de fractionnement. Nous avons choisi pour commencer le fractionnement des γ globulines, d'une part parce qu'elles constituent les immuno-globulines les plus faciles à isoler, d'autre part, parce que nous pouvions disposer d'une source de référence de γ globulines immunologiquement pure, aimablement fournie par le Dr FINE, du Centre National de Transfusion Sanguine (Directeur Prof. Ag. J.-P. SOULIER).

1^o *Méthode.* L'étude chromatographique sur DEAE cellulose d'une telle préparation a été effectuée par la méthode de tampons discontinus, semblable à celle utilisée par BISERTE (5).

1. Tampon phosphate de pH 8 molarité 0,005 M : fraction 1
2. Tampon phosphate de pH 8 molarité 0,010 M : fraction 2
3. Tampon phosphate de pH 8 molarité 0,020 M : fraction 3
4. Tampon phosphate de pH 7,5 molarité 0,035 M : fraction 4
5. Tampon phosphate de pH 7 molarité 0,050 M : fraction 5

Température de la colonne : $\pm 2^{\circ}\text{C}$. On passe au tampon suivant lorsque l'aiguille du spectrophotomètre enregistreur est revenue à sa position de base.

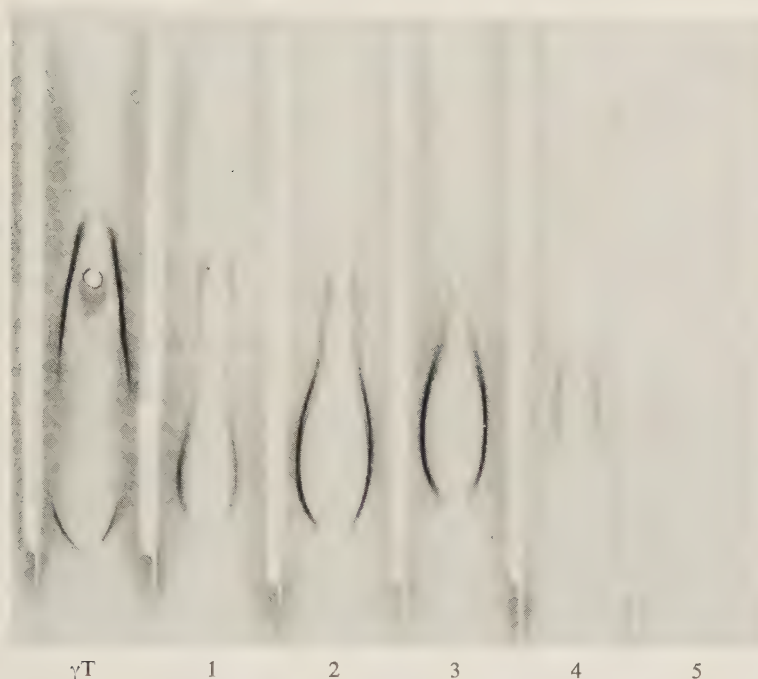


PHOTO N° 1 - Etude immunoélectrophorétique de la séparation chromatographique de γ globulines.

A chaque fraction correspond le tampon de même numéro.

γT : tracé obtenu à partir de α globulines purifiées.

2° Résultats. — Comme l'ont montré BISERTE (1960) (4), FAHEY et coll. (1962) (25), on obtient des fractions dont la mobilité en immunoélectrophorèse et en gel d'amidon est régulièrement croissante. Nous retrouvons dans la fraction 2 une bifidité anodique telle que la signale BISERTE (5). Toutes les protéines mises en place sur la colonne sont retrouvées dans ces 5 fractions avec un rendement de l'ordre de 90 %. Un tampon de molarité supérieure n'élue aucun pic (photo n° 1).

Un fait particulier est néanmoins à signaler. Lors d'un chromatogramme de sérum normal entier, on a parfois la surprise de retrouver une fraction présentant à l'électrophorèse un constituant γ globulinique. Or, cette fraction a ceci de particulier qu'il s'agit de la dernière du chromatogramme, celle qui est éluée par un tampon de molarité 0,30 M et de pH compris entre 4 et 5. Ces protéines γ globuliniques sont accompagnées d' α_1 globulines et des dernières fractions albuminiques éluées.

TOMBS et coll. (1961) (101), obtiennent une image analogue lorsqu'ils dressent la carte immunologique des fractions obtenues avec un sérum normal, mais n'en tiennent aucun compte dans leur discussion. Nous avons eu plusieurs fois l'occasion de retrouver une telle image d'une protéine de mobilité γ . Elle semble être visible uniquement lorsque le taux global des γ globulines atteint une certaine valeur (de l'ordre de 15 % des protéines totales). Nous avons retrouvé cette image particulièrement nette à l'occasion de l'étude

d'un sérum de γ myélome. Nous reviendrons sur ce problème à l'occasion de l'étude du β myélome.

3° La β_2A globuline.

A. DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

La place qu'occupe la β_2A globuline dans le chromatogramme, en ce qui concerne le sérum normal, est bien connue actuellement, et nous trouvons des résultats très concordants dans la littérature. Il faut citer à ce propos les travaux de FAHEY et coll. (25-28) qui utilisent un gradient continu et s'adressent au sérum entier. Ces auteurs obtiennent l'élution de la majeure partie de la protéine au niveau de la fin du premier tiers du chromatogramme, la protéine s'étageant de la fin du pic principal des γ globulines jusqu'au début de l'albumine. Un deuxième passage de β_2A globuline se produit dès la fin du pic de l'albumine au niveau de la fin du deuxième tiers du chromatogramme.

BISERTE et coll. (5), GOODMAN (42) observent un passage continu de la β_2A globuline débutant un peu après l'élution de la sidérophiline pour se terminer peu avant la fin du pic de l'albumine.

Ces résultats mettent en évidence une microhétérogénéité de cette globuline. BISERTE et coll. utilisant une méthode de fractionnement par gradient discontinu (5), ont réalisé une étude plus fine de cette protéine. Ces auteurs partent d'une fraction enrichie en β_2A par relargage au sulfate d'ammonium. Ils obtiennent une séparation, comme pour les γ globulines, de tout un ensemble de β_2A globulines de mobilité régulièrement croissante. Toutes ces fractions présentent une communauté antigénique totale par la méthode d'Ouchterlony. En gel d'amidon ces auteurs retrouvent trois types de composants : une zone diffuse, localisée dans la région des bandes d'Haptoglobine type 11 et de la « Slow α_2 », une fraction mineure Hp 11 plus homogène à vitesse de β_1 globuline et enfin une fraction très rapide occupant une position de « Fast α_2 globulines » pour les premières sous-fractions β_2A , puis intermédiaire aux « post albumines » et aux « Fast α_2 » globulines pour les fractions finales. D'après ces auteurs, le fait que les β_2A globulines ainsi obtenues ne se montrent jamais totalement pures, du point de vue immunologique, et soient toujours souillées de γ globulines, ne permet pas de conclure définitivement à l'existence en gel d'amidon de 3 groupes distincts de β_2A globulines.

B. TRAVAUX PERSONNELS

L'étude de la β_2A globuline par chromatographie sur cellulose modifiée est plus complexe que celle des γ globulines. En effet, dans le cas d'un sérum entier, la β_2A sort de la colonne au milieu du chromatogramme. De plus elle n'est jamais obtenue à l'état pur par chromatographie, mais entraîne toujours avec elle des γ globulines, de la sidérophiline, et même des protéines de mobilité α . Mais nous avons besoin pour notre étude du β_2A myélome d'un système de référence constitué par une protéine qui soit une β_2A au point de vue immunologique. Nous avons donc pour cela, préparé une β_2A globuline par la méthode d'HEREMANS, au moyen de la précipitation par les ions zinc. Nous donnons les détails de cette précipitation dans la première partie technique de ce travail. L'étude chromatographique que nous avons effectuée portait donc sur des protéines précipitables par l'ion zinc, et de nature immunologique β_2A .

1^o *Méthodes.* — Nous avons utilisé une séparation par gradient discontinu analogue à celle que nous avons employée pour les γ globulines. Seul le pH a été modifié pour l'adapter au pH isoélectrique de la protéine. L'élution a été conduite avec les 5 tampons successifs suivants :

- Tampon 1 phosphate de Na 0,005 M pH 8
- Tampon 2 phosphate de Na 0,010 M pH 8
- Tampon 3 phosphate de Na 0,020 M pH 8
- Tampon 4 phosphate de Na 0,035 M pH 7,8
- Tampon 5 phosphate de Na 0,050 M pH 7,8
- Tampon 6 phosphate de Na 0,20 M pH 4,4

2^o *Résultats.* — L'électrophorèse en gel d'amidon des fractions ainsi obtenues (photo n^o 2), montre :



PHOTO N^o 2 - Etude en gel d'amidon des fractions chromatographiques de β_2A globuline.

a) un premier constituant, donnant un aspect en « traînée » caractéristique de la β_2A , présentant une mobilité croissante de la fraction 2, à la fraction 5, de la fente d'inclusion au niveau de l'« α_2M » globuline ;

b) un second constituant, apparaissant dans la fraction 4 bien homogène, migrant au niveau de la sidérophiline ;

c) un troisième constituant de même apparence en « traînée » que le premier, de mobilité régulièrement croissante s'étendant depuis le niveau de la sidérophiline jusqu'à l'albumine, en apparaissant dans les fractions 3, 4 et 5.

L'immunoélectrophorèse pratiquée sur ces 5 fractions présente le tracé suivant :

a) une faible image dans la fraction 1 migrant au niveau de la β_2A globuline classique ;

b) un arc de précipitation de β_2A que l'on retrouve dans les fractions 2, 3 et 4 et qui présente une mobilité croissante ;

c) dans les fractions 2, 3, 4 et 5, un second arc de mobilité supérieure à celle de la β_2A globuline ;

d) la fraction 5 présente en outre un arc de précipitation supplémentaire de mobilité voisine de celle des α_2 globulines.

On peut conclure de ceci à une hétérogénéité de la β_2A globuline, comme le montrent les mobilités croissantes des fractions obtenues, en particulier en gel d'amidon (photo n° 2).

Par contre et bien que nos résultats soient en accord avec ceux de BISERTE, on ne peut tirer de conclusions, quant à l'existence de trois types de composants en gel d'amidon tels que les décrit cet auteur, faute de preuves. Tout au plus peut-on penser que le constituant le plus rapide du gel d'amidon de la fraction 4 est constitué de β_2A globuline, que le gel d'amidon permettrait de différencier. En effet, l'immunoélectrophorèse ne montre que 2 arcs de précipitation, le second correspondrait à la sidérophiline, qu'on retrouve en amidon.

D'autre part ce constituant rapide a l'aspect en « traînée » caractéristique de la β_2A .

Etant dépourvus d'antisérum spécifique de la β_2A globuline, nous n'avons pu poursuivre plus avant nos investigations dans cette direction.

3° La β_2M globuline.

Nous ne nous étendrons pas sur la séparation chromatographique de cette immunoglobuline dont l'étude n'apporte rien en ce qui concerne l'hétérogénéité de la paraprotéine β du myélome. Indiquons seulement sa place dans le chromatogramme, à la suite de la β_2A globuline. Une certaine hétérogénéité a également pu être mise en évidence par chromatographie pour cette protéine (GOODMAN, FAHEY).

Nous en terminerons ainsi avec ce rapide aperçu sur l'ensemble des immunoglobulines chez le sujet normal, telles qu'elles se présentent aux divers moyens d'investigation que nous possédons actuellement. Nous avons essayé de préciser la place occupée par ces immunoglobulines dans le chromatogramme tel que nous le fournit la DEAE cellulose. Partant de ces données obtenues chez le sujet normal, nous allons maintenant aborder le problème, du β myélome et de l'hétérogénéité de la paraprotéine correspondante, vue sous l'angle de la chromatographie.

II. APPORT DE LA TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE SUR DEAE CELLULOSE A L'ÉTUDE DES PARAPROTÉINES β_2 A MYÉLOMATEUSES

A. DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

La chromatographie sur cellulose modifiée a donné, en ce qui concerne les paraprotéines, des résultats semblables à ceux que nous avons signalés pour les protéines normales de définition immunologique correspondante. Le comportement chromatographique des paraprotéines classées par leurs déterminants antigéniques dans les β_2 A globulines est intermédiaire entre celui des γ globulines normales et pathologiques et celui des macroglobulines.

Mais, les résultats fournis par les divers auteurs ne concordent pas tout à fait en ce qui concerne la paraprotéine de type β_2 A. Est admise par tous la présence de γ globulines normales. La majorité de ces γ globulines normales est éluee en un pic en début de chromatogramme, à sa place habituelle. Elles sont quantitativement très diminuées (BISERTE 1961, FAHEY et coll. 1957-1962). Mais on peut les séparer de la protéine anormale à condition de donner au tampon de départ une molarité suffisamment basse (0,005 M).

Les paraprotéines γ sont éluées en un pic relativement aigu (FAHEY et coll. 1957-1962) et peuvent être séparées de la γ globuline normale (FAHEY 1962, BISERTE 1961). Il n'en est pas de même pour les protéines myélomateuses de type β_2 A. Non seulement elles ne peuvent être séparées de la β_2 A globuline normale (BISERTE 1961, FAHEY et coll.), mais leur élution présente des variations d'un sérum à l'autre, rendant nécessaire la standardisation des gradients d'élution si l'on veut obtenir des résultats comparables.

Le problème de l'hétérogénéité de ces paraprotéines en chromatographie sur cellulose n'a été jusqu'ici qu'à peine étudié. BISERTE (1961) signale que, à l'inverse des γ myélomes, l'élution de la β_2 globuline myélomateuse ne paraît pas homogène. Elle se caractérise par l'importance de la fraction éluee par un gradient de molarité 0,035 M, et par un affaiblissement également important de la fraction γ globulinique.

Mais l'étude chromatographique de la pluralité des paraprotéines β_2 A en gel d'amidon, envisagée dans un précédent travail (CREYSSEL et coll. 1962), ne semble pas avoir été poursuivie jusqu'ici. FAHEY (1962) montre que la DEAE cellulose permet d'amorcer la séparation des composants 9, 11, et 13 S de la protéine du β_2 A myélome.

Par contre, et contrairement à BISERTE, cet auteur admet une bonne corrélation entre la distribution chromatographique des γ , β_2 A protéines myélomateuses macroglobuline d'une part, et leur équivalent dans le sérum normal d'autre part. Il admet ainsi une similitude de composition entre la protéine

normale et pathologique, avec un degré d'hétérogénéité moindre pour la protéine pathologique que pour la normale.

Enfin, il admet que les composants 9 S, 11 S et 13 S de la β_2 A globuline myélomateuse seraient des polymères.

B. TRAVAUX PERSONNELS

Nous avons vu que notre étude des γ et β_2 A globulines normales par chromatographie sur DEAE cellulose nous a permis d'obtenir des résultats concordant avec ceux de la littérature. Ayant ainsi pu vérifier que notre technique était au point, nous avons abordé alors le problème de l'hétérogénéité des paraprotéines.

Protocoles expérimentaux

Toutes les fois que par chromatographie sur cellulose modifiée, il s'agit de séparer ou de purifier un constituant protéique donné, la difficulté consiste à partir d'un échantillon le plus pur possible. Tout au moins, il ne faut pas qu'il contienne de constituants ayant des caractéristiques semblables au point de vue de leur élution à celles du composé intéressant.

On aboutit alors à une séparation qui est loin d'être totale. Un exemple en est fourni par les γ globulines, dont l'élution ne fait qu'étirer le spectre des anticorps qui les compose, sans parvenir à une séparation complète.

Il en est de même dans le cas des paraprotéines myélomateuses, qui sont accompagnées, lors de leur élution de la colonne, d'autres protéines. C'est pourquoi nous avons préparé des fractions dégrossies, par électrophorèse sur colonne d'amidon, de cellulose et surtout par précipitation au moyen du sulfate d'ammonium. Mais, cette méthode pouvant être la cause d'une dénaturation partielle toujours possible des protéines, nous nous sommes d'abord adressés au sérum entier.

I. SÉRUM ENTIER

1^o Méthode

a) *Gradient continu*. Nous avons employé le système classique de FAHEY et coll. (28). Tampon de départ phosphate 0,005 M, pH 7,8 500 ml. Tampon d'élution phosphate 0,30 M pH 4,5 250 ml. Volume de l'échantillon de sérum: 7 ml. Débit: 22 à 25 ml/h.

b) *Gradient discontinu*. Nous avons utilisé la méthode n° 2 de BISERTE et coll. (5).

Tampon phosphate A	0,005 M	pH 8
B	0,010 M	8
C	0,020 M	7,8
D	0,035 M	7,5
E	0,050 M	7,5
F	0,5 M + ClNa 0,5 M	4,5

Chaque tampon provoque l'élution d'une certaine quantité de protéines, suivie au spectrophotomètre enregistreur. On ne passe au tampon suivant que lorsque l'aiguille de l'enregistreur est revenue à sa position initiale de base.

c) *Utilisation d'une deuxième colonne*, identique à la première et placée immédiatement sous elle.

Nous l'avons employée dans le but d'éliminer le phénomène de saturation de la colonne dans le cas où l'échantillon comprendrait une quantité trop importante de protéines. Cette deuxième colonne élimine également, théoriquement, l'interaction des protéines entre elles.

Supposons qu'une protéine A soit éluée de la première colonne de façon prématurée, soit par phénomène de saturation, soit par entraînement du fait de protéines voisines. La deuxième colonne équilibrée avec le même tampon fixera A électivement, tandis que les autres protéines la traverseront sans se fixer. Lorsque le tampon augmentera en force ionique, A sera, à son tour, éluée et retrouvera sa place parmi les protéines correspondantes. Ceci théoriquement améliore la séparation.

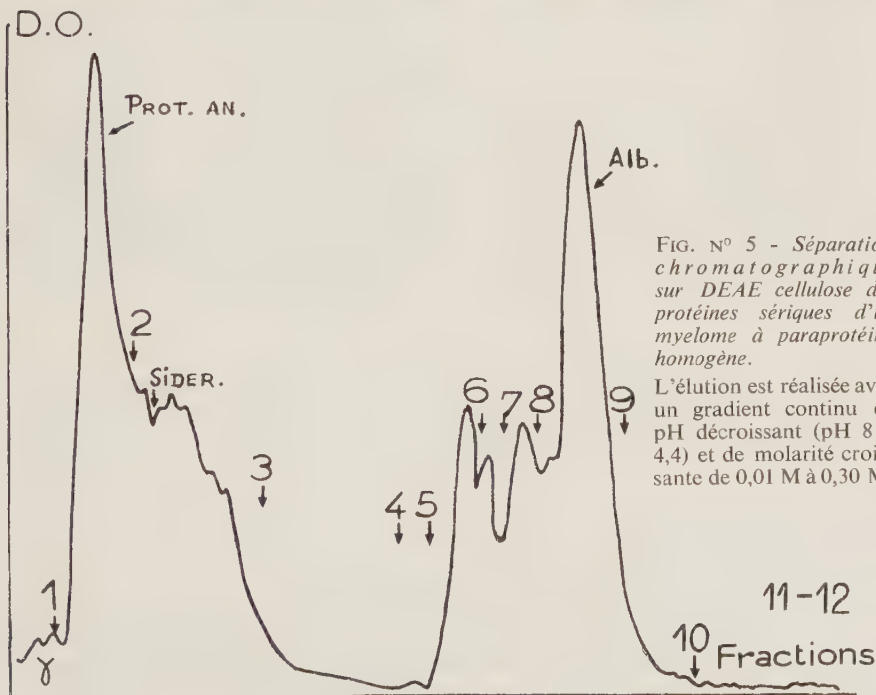
d) Reprise de chaque fraction obtenue, en une deuxième chromatographie, que par la suite nous appellerons chromatographie itérative.

Dans le même but que précédemment, chaque fois que nous avons à étudier un nouveau sérum, nous avons effectué au moins sur un échantillon une deuxième chromatographie de chaque fraction obtenue, en utilisant la seconde fois les mêmes tampons que pour la première chromatographie. Lors de la deuxième chromatographie, toute l'éluion doit théoriquement avoir lieu lors du passage d'un seul tampon, le même que celui utilisé dans le premier fractionnement.

2° Résultats

a) *Cas d'un sérum sans hétérogénéité.* — Nous avons pris deux exemples α) sérum n° 230.

Il s'agit dans ce cas particulier d'une BENCE JONES sanguine. Le chromatogramme en gradient continu donne le résultat suivant, vérifié en gel d'amidon.

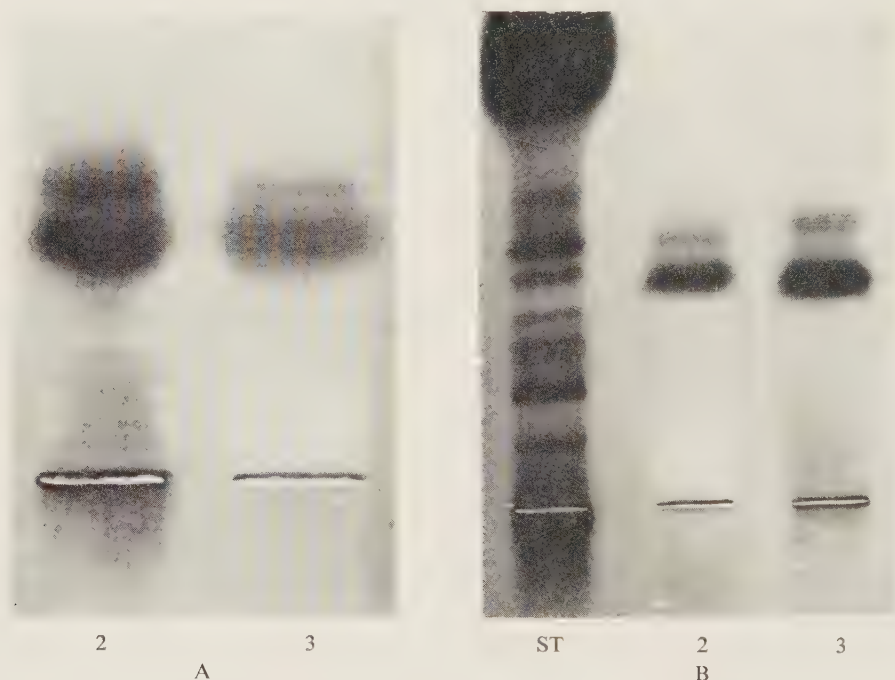


On constate que:

- les γ globulines sont en quantité très faible comme le montre l'électrophorèse du sérum total;
- la protéine anormale passe suivant un pic relativement homogène, accompagnée de sidérophiline (ce que vérifie l'immunoélectrophorèse);
- son passage sur DEAE cellulose ne montre pas d'hétérogénéité marquée.

L'immunoélectrophorèse de toutes les fractions obtenues ne montre pas la présence de la protéine anormale en dehors des fractions 2 et 3.

On recueille les fractions 2 et 3, on les concentre contre polyvinyl pyrrolidone, on les dialyse de nouveau contre le tampon de départ. Une deuxième chromatographie effectuée dans les mêmes conditions que la première montre les résultats suivants:



A: Etude en gel d'amidon des fractions 2 et 3 du chromatogramme d'un myélome à P.B.J.
B: Mêmes fractions après chromatographie itérative.
ST: Sérum témoin.

PHOTO N° 3.

- la protéine anormale est éluée dans la même zone que lors de la première chromatographie;
- elle est éluée suivant un seul pic, homogène;
- la séparation n'est pas meilleure que la première fois, en particulier la protéine anormale est toujours accompagnée de sidérophiline, comme le montre le gel d'amidon et le vérifie l'immunoélectrophorèse.

β) sérum n° 246.

Il s'agit d'un myélome ne présentant qu'un seul constituant, homogène en gel d'amidon.

Après électrophorèse en gel d'amidon des fractions, on constate que:

- la protéine anormale est éluée à partir de la fraction C;
- contrairement au cas précédent, son élution se poursuit jusqu'au tampon F, témoignant d'une hétérogénéité manifeste, contrairement à ce que montre la séparation par le gel d'amidon;
- enfin et contrairement au cas précédent également, une deuxième chromatographie d'une fraction montre de nouveau un étalement du chromatogramme des fractions A à F.

Cette hétérogénéité peut être pressentie sur le tracé chromatographique. Alors que pour la protéine de BJ, le pic caractéristique de la protéine est relativement pointu, dans le second cas son sommet est arrondi, et la partie descendante du pic présente une faible pente, le retour à la position d'équilibre étant lent. On obtient ainsi un pic dissymétrique, analogue à celui que montrent les γ globulines de TISELIUS en électrophorèse libre.

b) *Cas d'un myélome hétérogène à deux constituants.* — Nous avons pris un exemple: le sérum n° 330.

Il s'agit d'un β_2A myélome dont la protéine anormale se répartit en gel d'amidon suivant deux constituants distincts ne donnant qu'un seul trait de précipitation en immunoélectrophorèse. (On le vérifie par analyse immunologique après électrophorèse en gel d'amidon.) On obtient deux arcs au niveau des deux constituants qui se raccordent entre eux, complètement.

Le chromatogramme est effectué en gradient continu et réduit à 8 fractions.

On constate que, en gradient discontinu:

- le constituant le plus rapide commence à passer dans la fraction B et s'étale jusqu'en E, comme le montre l'immunoélectrophorèse;
- le constituant le plus lent est en quantité très faible dans la fraction B;
- il y a un enrichissement progressif du constituant le plus lent, contrairement au constituant le plus rapide;
- la fraction B est souillée de sidérophiline.

c) *Cas d'un β_2A myélome hétérogène à 4 constituants ou davantage.*

Nous avons pris un exemple: le sérum n° 252.

La paraprotéine de ce sérum est résolue par le gel d'amidon en au moins quatre constituants distincts, ce que vérifie l'analyse immunologique. Le chromatogramme par gradient discontinu présente l'image suivante en gel d'amidon. (Photo n° 4, p. 66.)

On constate que:

- le constituant le plus rapide présente un début d'élution pour le tampon C; son élution se poursuit très loin puisque la fraction F en présente encore des traces;
- les deux constituants les plus lents ne commencent à s'éluier qu'avec le tampon D;

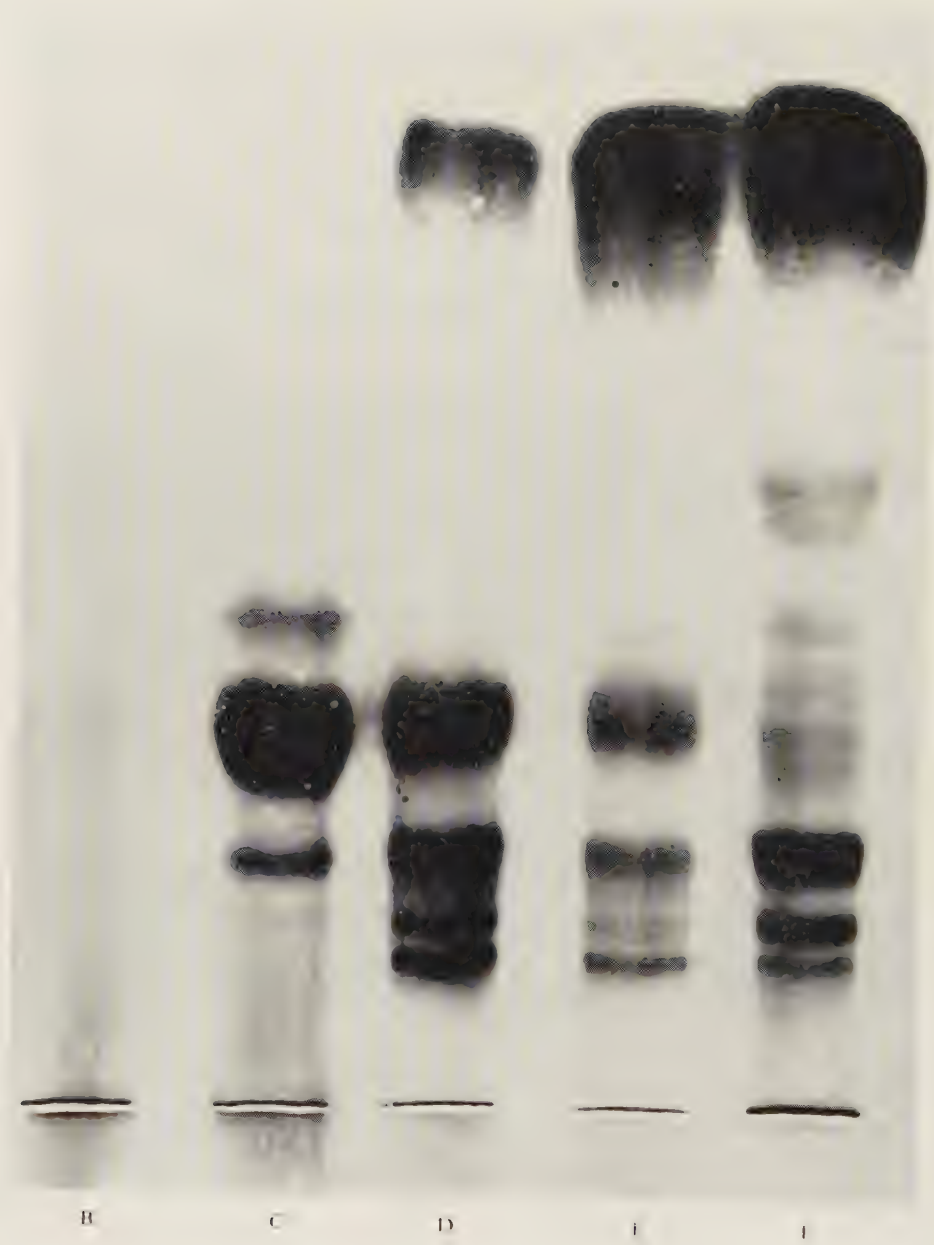


PHOTO N° 4 - Séparation chromatographique d'un sérum de β_2A myélome hétérogène à 4 constituants.

— comme dans le cas précédent, il y a enrichissement progressif en constituants les plus lents;

— la sidérophiline accompagne encore la paraprotéine au début de son élution;

— mêmes constatations avec un autre sérum analogue, mais dans ce cas le constituant paraprotéique le plus rapide est mieux individualisé, la fraction ne contient que de la sidérophiline comme impureté.

d) *Preuves de l'identité des fractions obtenues avec la paraprotéine myélomateuse.* — Comme nous l'avons vu, ces fractions donnent toutes à l'analyse immunologique un trait de précipitation confondu avec celui de la protéine anormale. De plus, ainsi que nous l'avons indiqué dans un précédent travail, une confrontation a été réalisée avec une préparation purifiée d'haptoglobine 2-2, préparée au Centre National de Transfusion Sanguine de Paris. En effet, l'aspect de cette paraprotéine hétérogène évoque celui que donne l'haptoglobine 2-2. La double diffusion en gélose par la méthode d'Ouchterlony ne montre aucune parenté antigénique entre l'haptoglobine 2-2 et les diverses fractions obtenues (16).

II. - CHROMATOGRAPHIE APRÈS ENRICHISSEMENT

La chromatographie d'un sérum total ne permet pas une purification totale d'un constituant. Dans le cas des paraprotéines, sont éluées en même temps toutes les protéines normales présentant des caractéristiques voisines au point de vue de l'analyse chromatographique; en particulier, la sidérophiline souille constamment les fractions B et C du chromatogramme, là où passe en grande abondance la fraction la plus rapide des paraprotéines hétérogènes de type β_2A .

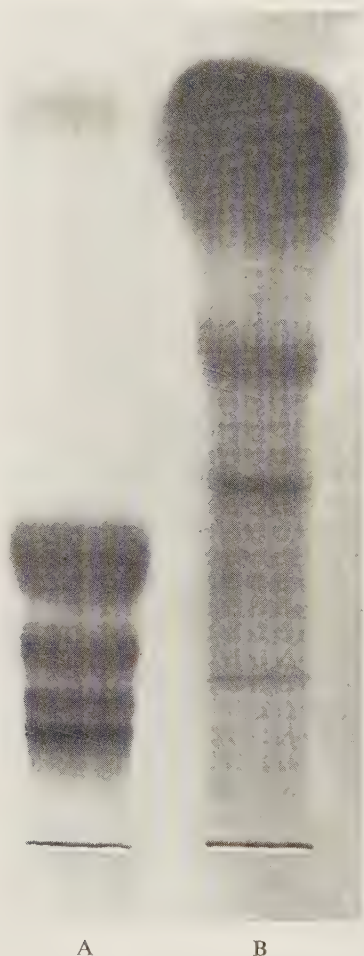
Pour augmenter les possibilités de purification par la DEAE cellulose, nous avons choisi de précipiter le sérum total par le sulfate d'ammonium à une concentration de 1,8 M, suffisante pour précipiter les β globulines, mais laissant les α globulines en suspension, de même que la sidérophiline. Comme d'autre part les myélomes β ne possèdent toujours qu'un faible pourcentage de γ globulines, on obtient un précipité contenant la paraprotéine en grande abondance.

1^o Méthodes

5 à 10 ml de l'échantillon de sérum sont additionnés d'eau distillée jusqu'à un total de 100 ml. On verse extemporanément le tout dans 100 ml de sulfate d'ammonium 3,6 M par petites quantités et en agitant vigoureusement. On obtient ainsi 200 ml de sulfate d'ammonium 1,8 M. On laisse reposer le tout une nuit à la glacière à 4 °C. Le lendemain, on laisse revenir la solution à la température du laboratoire avant de la centrifuger, 10 mn à 4.500 t/mn. Le précité est lavé deux fois par sulfate d'ammonium 1,8 M puis repris par la quantité minimale de sérum physiologique. On dialyse ensuite 48 heures contre sérum physiologique et on concentre contre polyvinyl pyrrolidone, afin de réduire le volume si besoin est. Après un contrôle électrophorétique immunologique et un gel d'amidon, on dialyse contre le tampon de départ afin d'effectuer la chromatographie. Celle-ci est effectuée exactement dans les mêmes conditions que le cas dans le sérum normal.

2° Résultats

Après précipitation par sulfate d'ammonium 1,8 M, précipité et surnageant donnent l'image suivante en gel d'amidon, à partir d'un β_2A myélome à 4 constituants (sérum n° 261). (Photo n° 5 ci-dessous.)



Après chromatographie en gradient discontinu, on observe comme dans le cas du sérum entier une élution du constituant le plus rapide à partir du tampon C, tandis qu'il y a enrichissement progressif en constituants les plus lents. La fraction F contient les deux constituants les plus lents.

Exemple: sérum n° 339 (hétérogénéité à au moins quatre constituants).

Etude de l'influence d'une 2^e colonne. — Nous avons utilisé à plusieurs reprises une 2^e colonne directement placée sous la première. Nous n'avons constaté aucune différence par cette méthode en ce qui concerne la séparation des constituants paraprotéiques.

PHOTO N° 5 - Précipitation d'un sérum de β_2A myélome hétérogène par le sulfate d'ammonium 1,8 M

A = précipité.

B = surnageant.

On remarque que les quatre constituants myéomateux constituent la fraction précipitable en presque totalité.

Influence de la chromatographie itérative de chaque fraction. — Dans le cas des β myélomes hétérogènes, et contrairement à ce que nous avons trouvé dans le cas de la BENCE JONES sanguine, on note un comportement différent des paraprotéines si l'on pratique une nouvelle chromatographie à partir d'une fraction donnée.

On constate que:

chaque fraction au second passage fournit une élution pour chaque tampon dans la méthode par gradient discontinu;

il y a une meilleure séparation des composants hétérogènes.

Exemple: sérum n° 261.

La fraction C après chromatographie itérative donne le résultat suivant :

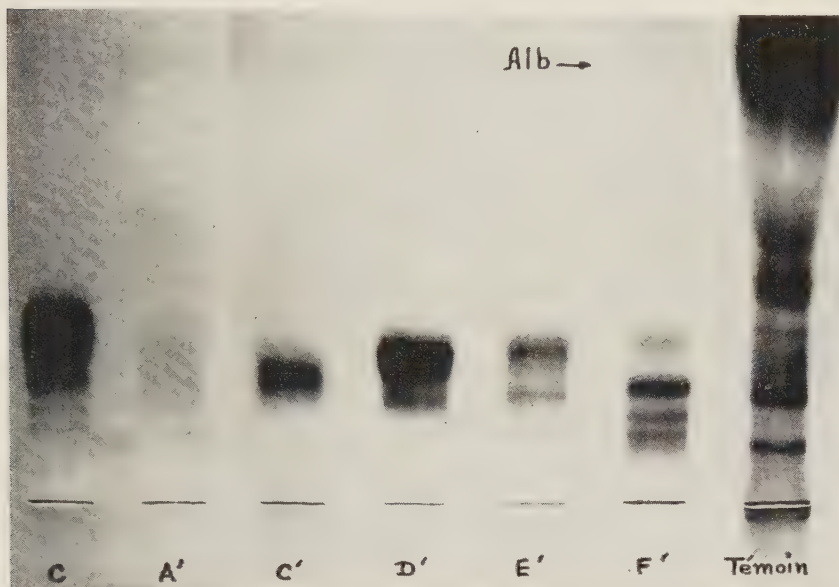


PHOTO N° 6 - Chromatographie itérative d'une fraction C.
Myélome à 4 constituants, précipité par $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 1,8 M.

Ceci n'est pas dû à la dénaturation des protéines, comme le montre l'expérience suivante: si on laisse volontairement une fraction F 48 heures à la température du laboratoire, on n'obtient plus du tout le même tracé. Si on obtient toujours une nouvelle séparation en cinq fractions de A à F, par contre il y a disparition de l'hétérogénéité qui est remplacée par la présence d'un composé de mobilité identique pour toutes les fractions se présentant « en traînée » comme la $\beta_2\text{A}$ globuline normale, et montrant une mobilité analogue à celle du constituant le plus rapide (dans la zone de la $\beta_2\text{A}$ physiologique) alors que la fraction F d'origine présente quantitativement une prédominance des fractions les plus lentes. D'autre part la fraction la plus abondante est la fraction D (alors qu'on s'attendrait plutôt à ce que ce fût la fraction F).

Cas de β myélomes à paraprotéine hétérogène et présentant en outre une protéine de BENCE JONES sanguine. — La protéine de BENCE JONES n'est pas précipitée par le sulfate d'ammonium 1,8 M. C'est donc par chromatographie du surnageant qu'on l'étudie.

On constate là encore une hétérogénéité, puisque cette protéine est éluée par les tampons C, D, E et F. On vérifie sa nature par la méthode de la fente courte, par comparaison avec la protéine urinaire.

Enfin, on vérifie son identité immunochimique avec les autres constituants myélomateux par la méthode d'Ouchterlony, et l'analyse immunologique à partir du gel d'amidon.

Les mobilités des constituants paraprotéiques. — Nous avons comparé dans un même tableau la place qu'occupent les paraprotéines dans le chromatogramme, dans le cas d'une protéine de BENCE JONES, de β myélomes à deux constituants, quatre constituants, enfin dans le cas de la β_2A physiologique préparée par la méthode d'HEREMANS. Dans le cas de myélomes hétérogènes, on a évalué en croix les constituants d'après l'importance quantitative respective de chaque constituant pour un même sérum. On constate une différence dans le début du passage de la protéine anormale. Les myélomes hétérogènes à 4 constituants ont une paraprotéine éluee plus tardivement que dans le cas de la BENCE JONES ou dans le cas de la β_2A normale (fig. n° 6: tableau).

Sérums n°s	Fractions chromatographiques						Nombre de constituants
	A	B	C	D	E	F	
261			+	+	+	+	4
				+	+	+	
236			+	+	+	+	4
						+	
236 ^o			+	+	+	+	4
					+	+	
252			+	+	+	+	4
				+	+	+	
284				+	+	+	4
					+	+	
339			+	+	+	+	4
				+	+	+	
310			+	+	+	+	4 (avec protéine de B.J.)
			+	+	+	+	
330		+	+	+			2
			+	+			
230		+	+	+			1 (B.J. sanguine)
β_2^A normale	+	+	+	+	+	traces	

FIG. N° 6 - Répartition des paraprotéines de type β_2A par rapport à la β_2A physiologique, au point de vue de leur mobilité chromatographique.

Nous n'avons figuré dans le cas de constituants multiples que le premier et le dernier. — On constate que l'élution du premier constituant ne se fait qu'à partir de la fraction C dans le cas de constituants multiples. — L'élution de la β_2A physiologique présente une élution beaucoup plus étalée.

Présence anormale d'albumine dans certaines fractions. — Nous avons eu la surprise de retrouver quelquefois des traces d'albumine là où on ne s'attendait pas à en trouver.

En effet, dans le cas d'un sérum de myélome hétérogène à 4 constituants, précipité par le sulfate d'ammonium et fractionné en gradient discontinu, la fraction obtenue par le tampon C ne contient pas d'albumine, d'une part parce que l'albumine ne précipite pas par le sulfate d'ammonium 1,8 M, d'autre part parce que le tampon C (0,020 M, pH 7,8) n'entraîne pas l'albumine. En effet, la fraction C obtenue dans de telles conditions ne montre pas la présence d'albumine à l'électrophorèse.

Or, si l'on rechromatographie la fraction C d'un tel chromatogramme, on obtient de nouveau une séparation en fractions B, C, D, E et F, avec dans la fraction F présence d'albumine, ébauchée en gel d'amidon et nettement visible en immunoélectrophorèse (photo n° 6, page 69).

Ce fait est à rapprocher d'une constatation que nous avons faite dans le cas d'un γ myélome. Nous avons constaté dans un tel cas un passage de la γ globuline en début de chromatogramme à sa place normale, et une deuxième élution de protéines ayant la mobilité d'une γ globuline en gel d'amidon, mais éluee tout à la fin du chromatogramme, comme si l'élution d'une fraction des γ globulines avait été retardée par une cause quelconque.

Or, la fin du chromatogramme coïncide également avec l'élution de l'albumine.

Premiers résultats fournis par la chromatographie sur Sephadex. — (Sephadex G200, 200-400 mesh, fourni par les Etablissements Pharmacia, Suède). Nos premiers résultats montrent une séparation partielle des constituants paraprotéiques, mais contrairement à ce que l'on observe par chromatographie sur DEAE cellulose, il y a un enrichissement progressif en constituants les plus rapides en gel d'amidon.

DISCUSSION

Envisageons d'abord quelques problèmes techniques et leurs conséquences.

PROBLÈMES TECHNIQUES

— On peut avoir une idée de la pureté chromatographique d'une fraction d'après le tracé obtenu à l'enregistreur.

— Une deuxième colonne placée sous la première n'améliore pas le fractionnement.

— La méthode par gradient discontinu donne des résultats qui ne sont pas inférieurs au point de vue de la séparation à ceux fournis par l'utilisation d'un gradient continu. Elle a l'avantage d'être reproductible, et ne subit pas l'influence des quantités de tampon mises en jeu, ni de la quantité des protéines à éluer.

Nous pensons pouvoir tirer les conclusions suivantes sur la signification biochimique des résultats obtenus:

SIGNIFICATION BIOCHIMIQUE DES RÉSULTATS OBTENUS

1° On retrouve pour les paraprotéines du type β une zone d'élution comprise entre celle des γ globulines et celle de la macroglobuline, en accord avec LAURELL, FAHEY, BISERTE.

2° Il y a enrichissement progressif en constituants de mobilité faible, contrairement à ce qui se passe pour les protéines normales, qui sont toutes éluées dans l'ordre croissant de leur mobilité électrophorétique.

3° Le début de l'élution de la protéine anormale est d'autant plus tardif que l'hétérogénéité de la paraprotéine est plus grande.

4° Il y a une variation dans la zone d'élution des paraprotéines β , hétérogènes ou non, lors d'une chromatographie itérative effectuée sur une fraction unique obtenue dans un premier temps. L'effet du vieillissement se ferait sentir en diminuant le nombre des constituants, et en faisant apparaître une image « en traînée » analogue à celle que l'on obtient avec la β_2A . Le phénomène rappelle ce que l'on obtient en traitant les constituants hétérogènes par des agents provoquant la rupture des ponts -SH, telle la cystéine (16).

5° Il y a une grosse hétérogénéité de chaque constituant, apparemment homogène en amidon.

6° L'albumine est probablement liée en partie à la protéine anormale, et ceci est en accord avec les données de HEREMANS (50) et de SILBERMANN (90). Le passage sur DEAE cellulose provoquerait la scission du complexe, tout au moins en partie.

Le problème est de savoir dans quelle mesure les données apportées par la chromatographie sur DEAE cellulose permettent d'éclairer la discussion sur la nature des paraprotéines, en particulier:

- existence ou non dans le sérum pathologique d'une protéine totalement différente de la protéine physiologique;
- présence ou non dans ce sérum d'une protéine normale en très grande quantité, et qui n'existe normalement qu'à l'état de trace;
- les paraprotéines sont-elles des produits de dégradation, des produits de synthèse incomplète, ou donnent-elles un complexe avec des protéines normales?

L'autre face du problème est celle qui concerne la nature des constituants du β -myélome hétérogène.

S'agit-il de polymères formés à partir d'un même motif de base, de poids moléculaire faible, ou au contraire de constituants de nature différente?

En faveur de l'existence de polymères, on trouve des résultats fournis par:

- l'ultracentrifugation (FAHEY) (25);
- la distribution en gel d'amidon suivant une échelle logarithmique (CREYSEL et coll.) (17) des constituants, distribution à laquelle participe la protéine de BENCE-JONES sanguine lorsqu'elle coexiste avec une hétérogénéité, en tant que constituant le plus rapide de l'ensemble.
- l'élution plus tardive en chromatographie des constituants les plus lents devient logique puisque les polymères sont retardés dans leur passage dans la colonne du fait de leurs dimensions.

Il en est de même en ce qui concerne l'élution plus tardive en chromatographie sur Sephadex G200 des constituants les plus rapides; on sait en effet, que, dans un tel milieu les molécules sont retenues par les mailles du Séphadex d'autant mieux qu'elles sont petites.

Contre l'existence de polymères, on peut mettre en avant la grande hétérogénéité en chromatographie de chacun des constituants myélomateux fournis par le gel d'amidon. Un composé bien défini devrait être élué de la colonne par un tampon bien défini.

Mais cette hétérogénéité n'est peut-être qu'apparente et due à un complexe de la protéine anormale avec l'albumine, ou une autre protéine physiologique. On peut interpréter les résultats obtenus lors d'une chromatographie itérative par le fait qu'une partie de l'albumine complexée est libérée à chaque nouveau passage sur la colonne, modifiant l'élution.

Il faudrait alors admettre que le complexe se dissocie totalement et d'emblée lors de l'électrophorèse en gel d'amidon; en effet, l'analyse immunologique des fractions paraprotéiques obtenues dans ce cas ne montre pas la présence d'un motif antigénique commun avec ceux de l'albumine.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1^o On retrouve par la chromatographie sur DEAE cellulose l'hétérogénéité de certaines protéines β myélomateuses montrée par l'électrophorèse en gel d'amidon. On peut séparer par chromatographie le constituant le plus rapide, et l'obtenir dans un état de purification avancée.

2^o Chaque sous-fraction, homogène en gel d'amidon, présente elle-même une microhétérogénéité manifeste par la méthode chromatographique.

3^o Il semble que l'on puisse mettre en évidence un complexe de la paraprotéine avec l'albumine, complexe dissocié en partie lors de son passage sur la DEAE cellulose.

4^o Les résultats obtenus par chromatographie sur DEAE cellulose comme ceux obtenus en gel d'amidon ne sont pas en désaccord avec l'hypothèse de l'existence de polymères, de même que les premiers résultats obtenus par chromatographie sur colonne de Sephadex G200. Les constituants paraprotéiques du myélome de type β^2A auraient un poids moléculaire d'autant plus élevé que leur mobilité en gel d'amidon est plus faible.

Remarquons cependant que ces différentes données, pour concordantes qu'elles soient, ne doivent en aucune façon être considérées comme une preuve définitive.

VU

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE :

(signé) : P. CROIZAT

VU

LE DOYEN DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE :

(signé) : H. HERMANN

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

LYON, le 4 février 1963

LE RECTEUR,

PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ :

(signé) : P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

Les références comportant le titre complet de la publication sont celles qui se rapportent directement aux paraprotéines myéloma-teuses et à la chromatographie.

1. AUGUSTIN, R. and HAYWARD, B.J. — Cleavage of human γ -globulin. *Nature*, 1960, **187**, 4732, 129-130, July 9.
2. BALLIEUX, R. E., and IMHOF, J. W. — Isolation and characterisation of β -Albumin. Protides of the biological fluids. 1961, Amsterdam.
3. BALLIEUX, R. E., IMHOF, J. W. and NIEHAUS, G. H. — Identification of so-called atypical macroglobulinaemia as an atypical form of β 2 A paraproteinemia : a new immunological entity. *Nature*, 1961, 189, 768.
4. BISERTE, G., HAVEZ, R., HAYEM, A. et LATURAZE, J. — *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1960, **250**, 418.
5. BISERTE, G., LATURAZE, J. et HAVEZ, R. — *Path. Biol.* 1961, **9**, 1673-1680. Applications de la chromatographie sur DEAE cellulose à l'étude des protéines du sérum sanguin.
6. BINETTE, J. P. et SCHMID, K. — *Nature*, 1961, **192**, 4804, 732-733.
7. BOMAN, H. G. et WESTLUND, L. E. — Protein chromatography on an anion exchange resin. *Arch. Biochem.* 1956, **64**, 217.
8. BRATTSEN, I. — *Arkiv. Kemi.* 1955, **8**, 347.
9. BURTIN, P., HARTMANN, E., HEREMANS, J., SCHEIDEGGER, J. J., WESTENDORP-BOERNA, F., WIEME, R., WUNDERLY, Ch., FAUVERT, R. et GRABAR, P. — Etudes immunochimiques et immunoélectrophorétiques des macroglobulinémies. *Rev. Franc. Etudes clin. et biol.* 1957, **2**, 161.
10. CEBRA, J. J., GIVOL, D., SILMAN, H. I. and KATCHALSKI, E. — *J. Biol. Chem.* 1961, **236**, 1720.
11. COOKE, K. B., TOMBS, M. P., SOUTER, F., WESTON, R. et MACLAGAN, N. F. — *Clin. Chim. Acta* 1959, **4**, 779.
12. CREYSEL, R., CILLE, Y., COULON, P. et MOREL, P. — Etude statistique de quelques caractères des protéines sanguines et urinaires au cours du myélome multiple. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1958, **40**, 469.
13. CREYSEL, R. et FINE, J. M. — Quelques schémas de corrélation des données fournies par diverses techniques d'étude des protéines sériques. *Transfusion II.* 1959, **2**, 127.
14. CREYSEL, R. and FINE, J. M. — Applications de l'électrophorèse en gel d'amidon à l'étude des anomalies sériques du myélome multiple et de la macroglobulinémie. *Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol.* 1959, **3**, 984.
15. CREYSEL, R., FINE, J. M. and MOREL, P. — Etude biochimique de quelques formes atypiques de dysprotéinémies. *Rev. d'Hematol.* 1959, **14**, 238.
16. CREYSEL, R., MANUEL, Y., RICHARD, G. B., FINE, J. M. — Sur le caractère hétérogène des paraprotéines des myélomes β . *Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol.* 1962, **7**, 253-259.
17. CREYSEL, R., RICHARD, G. B., MANUEL, Y., FINE, J. M. — Chromatographie sur DEAE Cellulose de sérums contenant des paraprotéines de type Beta, hétérogènes à l'électrophorèse en gel d'amidon. (*Sous presse*).

18. DEBRAY-SACHS, M., ANTOINE, B. et FINE, J. M. — Analyse immunologique du sérum humain normal après électrophorèse en gel d'amidon. *Rev. Franç. d'études Clin. et Biol.* 1961, n° 5, VI, 435-445.
19. DEUTSCH, H. F., ALBERTY, R. A., GOSTING, L. J. and WILLIAMS, J. W. — *J. Immunol.* 1947, **56**, 183.
20. DEUTSCH, H. F. et MORTON, J. I. — Human serum macroglobulins and dissociation units. I. Physicochemical properties. *J. Biol. Chem.* 1958, **231**, 1107.
21. DEUTSCH, H. F., MORTON, J. I. et KRACHTOVIL, C. H. — Antigenic identity of hyperglobulinemia serum components with proteins of normal serum. *J. Biol. Chem.* 1956, **222**, 39.
22. ENDERS, J. F. — *J. Clin. Invest.* 1944, **23**, 510.
23. FAHEY, J. L. — *Federation Proc.* 1959, **18**, 43.
24. FAHEY, J. L. — *Science*, 1960, **131**, 500.
25. FAHEY, J. L. — Chromatographic studies of anomalous β_2 A and macroglobulins and normal γ globulins in myeloma and macroglobulinemic sera. *The J. of Biol. Chem.* 1962, Vol. **237**, n° 2.
26. FAHEY, J. L. and GOODMAN, H. C. — *J. Clin. Invest.* 1960, **39**, 1259.
27. FAHEY, J. L. and HORBETT, A. P. — Human Gamma globulin fractionation on anion exchange cellulose columns. *J. Biol. Chem.* 1959, **234**, 2645.
28. FAHEY, J. L., Mc COY, P. F. and GOULIAN. — Chromatography of serum proteins of normal and pathologic sera. *J. Clin. Invest.* 1958, **37**, 272.
29. FAHEY, J. L., Mc COY, P. F. and HORBETT, A. P. — *Federation Proc.* 1958, **17**, 43.
30. FINE, J. M. and CREYSSEL, R. — Starch gel electrophoresis studies on abnormal proteins in myeloma and macroglobulinemia. *Nature*, 1959, **392**, **183**.
31. FINE, J. M. et CREYSSEL, R. — Contribution à l'étude immunochimique des globulines anormales du sérum au cours du myélome. *Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol.* 1961, **6**, 766.
32. FINE, J. M., CREYSSEL, R. et MOREL, P. — L'apport de l'électrophorèse en gel d'amidon à l'étude des constituants protéiques au cours des dysprotéinémies. *Rev. Hemat.* 1959, **14**, 73.
33. FINE, J. M. et LOEB, J. — Analyses immuno-électrophorétiques des fractions protéiques du sérum humain séparées par électrophorèse en gel d'amidon. *Experientia*, 1959, **15**, 59.
34. FINE, J. M., LOEB, J. et WASZCZENKO, E. — High resolution of human plasma components by starch gel electrophoresis. *Nature*, 1958, **182**, 452.
35. FRANKLIN, E. C. — Immunologic differences between the 7 S and 19 s components of normal human γ globulin : Antigenic specificity of the 7 S component. *Journ. August* 1960, **85**, 2.
36. FRANKLIN, E. C. and KUNKEL, H. G. — *J. Immunol.* 1957, **78**, 11.
37. FRANK W., PUTMAN, CAROLINE, W., EASLY and LYDIA, T. LYNN. — Site of cleavage of γ globulins by Papain. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1962, **58**, 279-290.
38. FRANK, W., PUTMAN, MARGARET, TAW, LYDIA, T., LYNN CAROLINE, W., EASLEY, and SHUNSUKE MIGITA. — The cleavage of Rabbit γ Globulin by Papain. *Journ. Biol. Chem. March* 1962, **237**, 3.
39. GOODMAN, M. *Nature*, 1960, **185**, 474.
40. GOODMAN, H. C., DEVAUX-St CYR, C., CLEVE, H., and GRABAR, P. — *Proceedings of the 8 Th Colloquium, Bruges*, 1960, p. 135.
41. GRABAR, P., FAUVERT, R., BURTIN, P. and HARTMANN, L. — *Rev. Franç. ét. Clin. Biol.* 1956, **1**, 175.
42. GOODMAN, H. C., MALMGREW, R. and FAHEY, J. L. — *J. Clin. Invest.* 1960, **39**, 1595.

43. GRABAR, P. et WILLIAM, C. A. — Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta* 10, n° 1, 1953, 113-194, 17, 1955, 67.
44. HANSON, L. A., JOHAWSSON, B. G. — Presence of Immunologically Active Fragments after Protoeolytic Degradation of Human γ -Globulin. *Nature*, August 13, 1960, **187**, 4737, 599.
45. HARRIS, H., PENINGTON, D. G. et ROBSON, E. B. — Electrophoresis of plasma proteins in starch gel. *Biochem. J.* 1960, 74, 3.
46. HAVEZ, R. et BISERTE, G. — Le tampon borate en électrophorèse de zone. *Clin. Chim. Acta*, 1959, 4, 334.
47. HAVEZ, R. et BISERTE, G. — Origine plasmocytaire d'une globuline myéломateuse β 2. Etude de ses rapports immuno-électrophorétiques avec la β 2 A globuline. *Clin. Chim. Acta*, 1959, 4, 694, 700.
48. HAVEZ, R., BISERTE, G. LEROY, N., LATURAZE, J., BONIFACE, L. *Path. Biol.*, 1961, 9, 1689-1704.
49. HEREMANS, J. F. — Immunochemical studies on protein pathology. The immunoglobulin concept. *Clin. Chim. Acta* 4, 1959, 639-646.
50. HEREMANS, J. — Les globulines sériques du système gamma. 1960. *Editions Arsia S.A. Bruxelles. Masson & Cie, Paris.*
51. HEREMANS, J. — Proceedings of the 7 Th Congress of the international Society of Hematology. Rome 1958.
52. HEREMANS, J. F., HEREMANS, M. Th. et SCHULTZE, H. E. — Isolation and description of a few properties of the β 2 A globulin human serum. *Clin. Chim. Acta*, 1959, 4, 96 et 102.
53. HEREMANS, J. F., LAURELL, A. H. F., MARTENSON, L., HEREMANS, M. Th., LAURELL, C. B., SJOQUIST, J., WALDENSTROM, J. — Studies on "abnormal" serum globulins (M-components) in myéloma, macroglobulinemia and related diseases. *Lund*. 1961.
54. HOWARD, C., GOODMAN, Ch. DE VAUX-St CYR, HARTWIG CLEVE and P. GRABAR. — Immuno-electrophoretic studies of normal serum fractionated by anion exchange Cellulose column chromatography. Protides of the biological fluids. *Proceedings of the 8 Th Colloquium Bruges* 1960.
55. IMHOF, J. W., and BAILLEUX. — *Acta Med. Scand.* 1961, 170, 449.
56. IMHOF, J. W., BAILLEUX, R. E., and MIJNLIEFF, P. E. — *Clin. Chim. Acta* 1960, 5, 801.
57. JAHNKE, K. et SCHOLTAN, W. — Atypische Makroglobulinamien. *Ver. Otsch. Ges. Inn. Med.*, 1957, **23**, 312.
58. KABAT, E. A. — *Am. J. Med.*, 1957, **23**, 299.
59. KEKWICK, R. A. — *Biochem. J.* 1940, **34**, 1248.
60. LAPRESLE, C., KAMINSKI, M., and TANNER, C. E. — *J. Immunol.*, 1959, **82**, 94.
61. LASPALLUTO, J., CHEGORIANSKY, J., LEWIS, A., and ZIFT, M. — *J. Clin. Invest.* 1960, 39, 473.
62. LAURELL, C. B. — *Acta Med. Scand. Supp.* 1961, 367, 60-64.
63. LAWRENCE, S. H., BENJAMIN, D. C. — *Clin. Chim. Acta*, 1961, 6, 398.
64. LAWRENCE, S. H., BENJAMIN, D. C. — Multidimensional study of plasma proteins. *Clin. Chim. Acta*, 1961, **6**, n° 3.
65. McFADDEN, M. L., and SMITH, E. L. — *J. Am. Chem. Soc.* 1953, 75, 2784.
66. MORETTI, J., BOUSSIER, G., et JAYLE, N. F. — Nouvelle méthode de purification des protéines par électrophorèse en gel d'amidon. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1958, 40, 59.

67. MORETTI, J., BOUSSIER, G., HUGOU, M. P., et HARTMANN, L. — Recherche des correspondances entre les résultats des électrophorèses sur papier, à travers gel d'amidon et de l'immunoélectrophorèse en gélose des protéines du sérum. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1959, 41, 79.
68. MULLER-EBERHARD, H. J. and KUNKEL, H. G. — *J. Exptl. Med.*, 1956, **104**, 253.
69. MULLER-EBERHARD, H. J., and KUNKEL, H. G. — *Clin. Chim. Acta*, 1959, **4**, 252.
70. NISONOFF, A., WISSLER, F. C., LIPMAN, L. N., and WOERNLEY, D. L. — *Arch. Biochem. Biophys.* 1960, **89**, 230.
71. O'DONNELL, I. J. and THOMPSON, E. O. P. — The effect of temperature on the chromatography of insulin in DEAE cellulose. *Austr. J. Biol. Sciences*, 1960, **13**, 69.
72. OSSERMAN, E. F. and LAWLOR, D. — Immuno-electrophoretic characterization of the serum and urinary proteins in plasma Cell myeloma and WALDEN-STROM'S Macroglobulinemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. August 31, 1961, **94**, I, P ; 93.
73. OUTCHERLONY, O. — Antigen antibody reactions in gels. *Acta Path. Microbio Scand*, 1949, 507-515.
74. OWEN, J. A., GOT, C. et SILBERMAN, H. J. — Heterogeneity of serum myeloma globulins. *Clin. Chim. Acta*, 1958, **3**, 605.
75. PETERSON, E. A. et SOBER, H. A. — Chromatography of proteins I. Cellulose on exchange adsorbents. *J. Am. Chem. Soc.* 1956, **78**, 751.
76. PORATH, J. and FLODIN, P. *Nature*, 1959, **183**, 1657.
77. PORATH, J. — Some cellulose ion exchanges of low substitution and their chromatographic applications. *Arkiv. KEMI*. 1957, **11**, 97.
78. PORTER, R. R. — *Biochem. J.* 1959, **73**, 119.
79. PORTER, R. R. — Fractionation of rabbit gamma-globulin by partition chromatography. *Biochem. J.* 1955, **59**, 405.
80. PORTER, R. R. — *Nature* 1958, **182**, 670.
81. POULIK, M. D. and EDELMAN, G. M. — Comparison of reduced alkylated derivatives of some myeloma globulins and Bence-Jones proteins. *Nature*, Sept. 23 1961, **191**, n° 4795, p. 1274.
82. POULIK, M. D. and SMITHIES. — *Biochem. J.* 1958, **68**, 636.
83. POULIK, M. D. — Starch gel immuno-electrophoresis. *Immunology* 1959, **82**, 502.
84. POULIK, M. D., ZYELZER, W. W. et MEYER, R. — Separation of fast moving Gamma-globulins by starch gel electrophoresis. *Nature* 1959, **184**, 1800.
85. PUTMAN, F. W. — Abnormal human serum globulins-I. Non identity of macroglobulins. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959, **79**, 67.
86. PUTMAN, F. W., FRANK, W. — The plasma proteins 1960. *Academic Press. New York and London*.
87. RALPH, L., ENGLE, J. M. D., KENNETH, R., WOODS, P. D., GERMAN, B., CASTILLO, M. D. and JAMES, H. O. PERT, M. D. — Starch gel electrophoresis of serum proteins and urinary proteins from patients with multiple myeloma macroglobulinemia, and other forms of dysproteinemia. *Journ. of Labor. and Clin. Medicina. St Louis.* July 1961, **58**, n° I, P. 1-22.
88. SCHEIDEGGER, J. J. et BUZZI, C. — Etude Immunoélectrophorétique des Gamma-globulines. *Rev. Franç. Etudes clin. et Biol.* 1957, **2**, 895-906.
89. SCHEIDEGGER, J. J. — Une microméthode de l'immuno-électrophorèse. *Inter. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1955, **7**, 103-110.
90. SILBERMANN, H. J. — Zone electrophoresis of serum β Globulins on starch gel. *Biochim. et Biophys. Acta* 1957, **24**, 647.
91. SMITH, E. L., BROWN, D. M., Mc FADDEN, M. L., BUETTNER-JANUSH, V. et JAGER, B. V. — Physical chemical and immunological studies on globulins from multiple myeloma. *J. Biol. Chem.* 1955, **216**, 601.

92. SMITHIES, O. — *Biochem. J.* 1959, 71, 585.
93. SMITHIES, O. — Zone electrophoresis in starch gel: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. Journ.* 1955, 61, 629-641.
94. SOBER, H. A., GUTTER, F. J., WYCKOFF, M. M. and PETERSON, E. A. — Chromatography of proteins. II Fractionation of serum protein on anion exchange cellulose. *J. Amer. Chem. Soc.* 1956, 78, 756.
95. SOBER, H. A. and PETERSON, E. A. — Chromatography of proteins on modified cellulose. *Vox Sang. Basel* 1957, 2, 62.
96. SOBER, H. A. and PETERSON, E. A. — *Federation Proc.* 1959, 17, 1116.
97. STEINBERG, D. and MIHAYLI, E. — Annual review of biochemistry, Vol. 26, *Annual Reviews, Inc. Palo Alto, California*, 1957, P. 373.
98. SUBISKI, S. and KELUS, A. — Antigenic differences between Gamma-Globulins of individual rabbits. Protides of the Biological fluids. *Proceeding of the 8 Th Colloquium. Bruges* 1960, 172-175.
99. TISELIUS, A. — *Biochem. J.* 1937, 31, 1464.
100. TOMBS, M. P., COOKE, K. B., BURSTON, D. and MAC LAGAN, N. F. — The chromatography of normal serum proteins. *Biochem. J.* 1961, 80, 284.
101. TOMBS, M. P., JAMES, D. C. O., MACKAGAN, N. F. — Chromatography of serum proteins with special reference to Gamma-globulins. *Clin. Chim. Acta* 1961, 6, 163.
102. TOMBS, M. P., COOKE, K. B., BURSTON, D. and MACLAGAN, N. F. — The chromatography of normal serum proteins. *Biochem. J.* 1961, 80, 284.
103. WALDENSTROM, J. — *Acta. Med. Scand.* 1944, 117, 216.
104. WALLENIS, G., TRAUTMAN, R., KUNKEL, H. G. and FRANKLIN, E. C. *Biol. Chem.* 1957, 225, 253.
105. WIEME, R. J. — An improved technique of agar-gel electrophoresis on microscope slides. *Clin. Chim. Acta*, 1959, 4, 317.
106. WILLIAMS, C. A. Jr. and GRABAR, P. — *J.-Immunol.* 1955, 74, 158.

TABLE DES MATIÈRES

	PAGES
INTRODUCTION	19
PREMIÈRE PARTIE	
I. GÉNÉRALITÉS	23
A) <i>Historique</i>	23
— Séparation des protéines par chromatographie sur colonne	23
— Séparation des protéines du sérum sur cellulose échangeuse d'ions	23
— Propriétés de ces celluloses	24
B) <i>La méthode chromatographique sur DEAE et CM cellulose</i>	24
1) Leur principe de fonctionnement	24
— Technique de préparation de la DEAE et de la CM cellulose	25
2) Mode d'emploi de ces celluloses	25
3) Caractéristiques physicochimiques de la DEAE cellulose	26
a) Caractéristiques mécaniques	26
b) Capacité de la cellulose	26
c) Conditions optimales d'utilisation de la cellulose	27
d) Conditions de fixation et d'élution des protéines	27
α) Influence de la température	28
β) Influence du pH	28
γ) Influence de la force ionique	28
δ) Influence des autres protéines du milieu	29
II. LA TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE TELLE QUE NOUS L'AVONS MISE EN ŒUVRE	30
A) <i>Matériel et méthodes</i>	30
1) Montage de la colonne	30
2) Caractéristiques de la cellulose	31
a) Quantité de cellulose	31
b) Dimensions de la colonne	31
c) Volume mort	31
d) Le débit	32
	83

	PAGES
3) Mise en place de l'échantillon à chromatographier	32
4) Alimentation de la colonne	33
a) Elution par gradient discontinu	33
b) Elution par gradient continu	33
— Gradient linéaire	34
— Gradient de forme exponentielle	34
— Autres gradients	38
5) Réalisation pratique	39
B) <i>Contrôle électrophorétique des fractions</i>	40
a) Concentration	40
b) Méthodes électrophorétiques	41
1) Tisélius	41
2) Papier	41
3) Gélose	41
4) Immunoélectrophorèse	42
5) Gel d'amidon	44
6) Analyse immunologique à partir d'une électrophorèse en gel d'amidon	44
7) Préparation de fractions enrichies en vue de la chromatographie.	44

DEUXIÈME PARTIE

I. LES GLOBULINES DU SYSTÈME GAMMA	47
— Apport des méthodes de fractionnement du plasma	48
— Apport de l'immunoélectrophorèse	48
— Apport de l'électrophorèse en gel d'amidon	49
II. LE PROBLÈME DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DES GLOBULINES DU SYSTÈME GAMMA TELLES QUE LES DÉFINIT L'IMMUNOÉLECTROPHORÈSE	50
1) <i>Les γ globulines</i>	50
— Ultracentrifugation	50
— Gel d'amidon	50
— Hydrolyse enzymatique	51
— Caractères antigéniques	51
2) <i>La γ_2A globuline</i>	52
— Ultracentrifugation	52
— Immunoélectrophorèse	52
— Caractères antigéniques	52
3) <i>La γ_2M globuline</i>	52

III. L'HÉTÉROGÉNÉITÉ ÉLECTROPHORÉTIQUE DES PARAPROTÉINES β_2A MYÉLOMA- TEUSES	53
a) L'apport de l'électrophorèse sur papier	53
b) L'ultracentrifugation	53
c) L'immunoélectrophorèse	53
d) L'électrophorèse en gel d'amidon	53

TROISIÈME PARTIE

I. L'APPORT DE LA TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE A L'ÉTUDE DES IMMUNO- GLOBULINES	55
1) <i>Les γ globulines</i>	55
A) Données bibliographiques	55
B) Travaux personnels	56
1) Méthodes	56
2) Résultats	57
2) <i>La β_2A globuline</i>	58
A) Données bibliographiques	58
B) Travaux personnels	58
1) Méthodes	59
2) Résultats	59
3) <i>La β_2M globuline</i>	60
II. L'APPORT DE LA TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE A L'ÉTUDE DES PARA- PROTÉINES β_2A MYÉLOMATEUSES	61
A) Données bibliographiques	61
B) Travaux personnels	62
Protocoles expérimentaux	62
I. SÉRUM ENTIER	62
1) <i>Méthodes</i>	62
a) Gradient continu	62
b) Gradient discontinu	62
c) Utilisation d'une deuxième colonne	62
d) Chromatographie itérative	63
2) <i>Résultats</i>	63
a) Sérum sans hétérogénéité	63
b) Hétérogénéité à deux constituants	65
c) Hétérogénéité à quatre constituants ou davantage	65
d) Preuves de l'identité des fractions obtenues avec la protéine myélomateuse	67

	PAGES
II. CHROMATOGRAPHIE APRÈS ENRICHISSEMENT	67
1) <i>Méthode</i>	67
2) <i>Résultats</i>	68
— Etude de l'influence d'une deuxième colonne	68
— Influence de la chromatographie itérative	68
— Cas de β myélomes hétérogènes à protéine de BENCE JONES sanguine	69
— Les mobilités des constituants paraprotéiques	70
— Présence anormale d'albumine dans certaines fractions	71
— Premiers résultats fournis par la chromatographie sur Sephadex	71
DISCUSSION	73
PROBLÈMES TECHNIQUES	73
SIGNIFICATION BIOCHIMIQUE DES RÉSULTATS OBTENUS	73
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	75
BIBLIOGRAPHIE	77
TABLE DES MATIÈRES	83

